



HAL
open science

Thérapie génique In-vivo : état de l'art réglementaire, technologique et produits

Richard Pontremoli

► **To cite this version:**

Richard Pontremoli. Thérapie génique In-vivo : état de l'art réglementaire, technologique et produits. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03026220

HAL Id: dumas-03026220

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03026220>

Submitted on 26 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 16 NOVEMBRE 2020

PAR

Mr Richard PONTREMOLI

Né le 17 Juin 1993 à Marseille

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Thérapie Génique In-vivo : État de l'art règlementaire, technologique et produits

JURY :

Président : Monsieur le professeur Christophe Dubois

Membres : Madame Véronique Andrieu
Madame Lisa Scibetta

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission : Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires : M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet : Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité : Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
--	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

Remerciements

A monsieur le Professeur Christophe Dubois, pour avoir accepté de présider le jury de thèse et pour y avoir apporté toute son expertise et expérience.

A madame Véronique Andrieu pour avoir accepté le rôle de directeur de thèse. Merci pour vos conseils précieux lors de la rédaction de cette thèse.

A madame Lisa Scibetta, pour avoir accepté de faire partie du jury. Merci pour le temps passer à relire la thèse ainsi qu'à tes précieux conseils. Ton expérience m'a apporté un soutien important dans la dernière ligne droite de ce projet.

Merci à ma mère et à ma sœur pour la présence et pour le soutien durant ces longues années. Rien n'aurait été possible sans elles.

Merci à Solène Riché d'être à mes côtés.

Merci à mes amis et à toutes les personnes qui m'ont accompagné durant ces études : Professeurs, maitres de stages etc. Vous m'avez permis d'exercer aujourd'hui un métier passionnant et plein d'avenir.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Sommaire

I- INTRODUCTION	15
II- LES SPECIFICITES DE LA REGLEMENTATION DE LA THERAPIE GENIQUE	21
A- Les médicaments de thérapie génique dans les médicaments de thérapie innovante	21
B- Le processus de développement d'un médicament de thérapie génique	25
1- La phase préclinique	25
2- La phase clinique	26
Nouveau cadre réglementaire européen	27
Réglementation actuelle – Cas de la France	30
Accélérer l'accès à l'innovation : Fast track	34
3- Dossier de demande d'AMM	36
Procédure de demande d'AMM	38
Aides au développement de médicaments de thérapie génique	42
4- Les mesures post- autorisation de mise sur le marché	45
C- Les challenges réglementaires au développement des thérapies géniques	46
1- Confirmer et Harmoniser le cadre réglementaire	46
2- Modèle préclinique et clinique	47
III- LES TECHNOLOGIES DE THERAPIE GENIQUE IN-VIVO	48
A- Concepts généraux	48
B- Les Vecteurs	50
1- Les vecteurs viraux	50
Les Lentivirus	51
Adénovirus	52
Adeno Associated Virus	53
2- Les vecteurs non viraux	54
Plasmide ADN	55
Les vecteurs de synthèse	55
Les méthodes physiques de transfert	56
Les méthodes inorganiques	57
3- Le choix du vecteur	58
C- Les technologies de thérapie génique in vivo	60
1- Transfert d'acides nucléiques in vivo	60
Ajout d'une protéine fonctionnelle	60
Utilisation de gène suicide	61
Inhibition d'une protéine fonctionnelle	62
2- Les oligonucléotides : Gene silencing ou extinction de gènes	62
Les ARN antisens	62
ARN interfèrent ARNi	64
3- Les techniques d'édition du génome ou « gene editing »	66
Les TALEN	66
Les Méganucléases	67
Les nucléases à doigts de zinc (ZFN)	68
La technique CRISPR / CAS9	68
4- Virus Oncolytique	70
5- La technique des CAR T cell in vivo	71

D- Les difficultés cliniques et thérapeutiques de la thérapie génique in vivo	72
IV- ÉTAT DES LIEUX DES PRODUITS ET DU MARCHÉ DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE IN VIVO	75
A- Les produits commercialisés	75
1- Les oligonucléotides commercialisés	76
Les ARN interférents	76
Les ARN antisens	77
2- Étude des produits de thérapie génique par transfert de gène in vivo commercialisés	79
3- Analyse des produits commercialisés	82
B- Les produits en développement	85
C- Les laboratoires développant des thérapies géniques	87
D- Les challenges menaçant la mise sur le marché des thérapies géniques	91
1- La production à grande échelle	91
Principes de production des thérapies géniques	94
Production des thérapies géniques : Le passage à l'échelle industrielle	95
2- Les difficultés de la chaîne d'approvisionnement	100
3- Prix et remboursement des médicaments de thérapie génique	102
V- CONCLUSION	104
VI- BIBLIOGRAPHIE	106
VII – ANNEXES	118

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié de la Biologie Moléculaire ¹	16
Figure 2 : Représentation des étapes de l'ADN aux protéines ²	17
Figure 3 : Les deux principales stratégies de thérapie génique ⁵	18
Figure 4 : Histoire simplifiée de la thérapie génique	19
Figure 5 : Evolution de nombre de publication concernant la thérapie génique ⁶	20
Figure 6 : Demande d'autorisation d'essai clinique Européen.....	29
Figure 7 : Délais d'une demande d'autorisation d'essai clinique européen sans questions.....	30
Figure 8 : Procédure d'autorisation d'un essai clinique MTI en France ¹²²	31
Figure 9 : Les délais d'une procédure Fast Track ²³	35
Figure 10 : Organisation du Common Technical Document ²⁷	36
Figure 11 : Calendrier d'évaluation pour une AMM	41
Figure 12 : Système de surveillance post AMM des MTI ⁴⁰	46
Figure 13 : Les deux voies de la thérapie génique ⁴¹	48
Figure 14 : Les différentes applications des thérapies géniques ⁴²	49
Figure 15 : Principales caractéristiques des vecteurs viraux.....	54
Figure 16: Tropisme des sous types d'AAV	59
Figure 17 : Mécanisme d'action d'un ARN Antisens ⁶⁸	63
Figure 18 : Mécanisme d'action des SiRNA ⁷²	65
Figure 19 : Mécanisme d'action des miRNA ⁷³	66
Figure 20: Mécanisme d'action de CRISPR/Cas9 ⁸¹	69
Figure 21 : Comparaison des techniques d'édition du génome ⁸²	70
Figure 22: Mécanisme d'action des virus oncolytiques ⁸⁵	71
Figure 23 : Les CAR T cell ex vivo ⁸⁶	71
Figure 24 : La technique du saut d'exon ⁹⁶	77
Figure 25: Obtention AMM de médicaments de thérapie génique par transfert de gène au cours du temps.....	83
Figure 26: Obtention AMM des oligonucléotides au cours du temps.....	83
Figure 27 : Evolution des ventes des produits de thérapie génique in vivo ¹⁰²	84
Figure 28 : Evolution du nombre d'essais cliniques de thérapie génique au cours du temps et répartition par phases ¹⁰³	85
Figure 29 : Répartition des essais cliniques selon le type de vecteur utilisé ¹⁰⁴	86
Figure 30: Aires thérapeutiques des produits en développement.....	87
Figure 31 : Top 20 des sociétés développant des thérapies géniques	88
Figure 32 : Evolution des deals entre Biotech et BigPharma.....	88
Figure 33 : Proportions de molécules commercialisées à l'origine développées par des petites entreprises. ¹⁰⁵	90
Figure 34 : Production transitoire Vs Production stable ¹⁰⁹	93
Figure 35 : Différentes étapes de production d'un vecteur viral ¹¹¹	94
Figure 36 : Scale Up Vs Scale Out ¹¹⁸	98
Figure 37 : Représentation des BioProducteurs en France ¹²⁰	98
Figure 38 : Nombre de sites capables de produire pour chaque technologie	99
Figure 39 : Stratégie In vivo Vs Ex vivo.....	101

Liste des abréviations

AAV	Vecteur viral adeno-associé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	l'Agence nationale du médicament et des produits de santé
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interfèrent
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product
BPC	Bonnes Pratiques Cliniques
BPI	Banque Publique d'Investissement
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CAT	Comité pour les médicaments innovants
CHMP	Comité des médicaments à usage humain
CMO	Contract manufacturing organisations
COMP	Committee for Orphan Medicinal Products
CSP	Code de santé publique
CSIS	Conseil stratégique des industries de santé
CTD	Common Technical Document
CTIS	Système d'information sur les essais cliniques
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products
EMA	European Medicines Agency
FokI	Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I
GTWP	Gene Therapy Working Party
hATTR	Amylose à Transthyrétine Hériditaire
HCB	Haut Conseil des Biotechnologies
HMPC	Committee for Herbal Medicinal Products
ITF	EMA's Innovation Task Force
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
miRNA	microRNA
MTI	Médicaments de Thérapies Innovantes
MTI-PP	Médicaments de Thérapies Préparés Ponctuellement
OGM	Organisme Génétiquement Modifié

PDCO	Paediatric Committee
PIA	Programme d'investissement d'avenir
PIP	Plan d'Investigation Pédiatrique
PME	Petites et moyennes entreprises
PRAC	Pharmacovigilance Risk Assessment Committee
RIPH	Recherches impliquant la personne humaine
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RPE65	Epithélium Pigmentaire Rétinien 65
siRNA	small interfering RNA
SMA	Amyotrophie musculaire spinale
TALE	Transcription Activator-Like Effector
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
ZFN	Nucléases à doigts de zinc

I- Introduction

L'Histoire de la pharmacie est longue et constituée de différentes étapes. Depuis l'origine de l'humanité, les Hommes sont malades et essaient de se soigner.

Dans une première phase, la médecine était liée à la religion. Les Hommes invoquaient les Dieux pour se soigner.

Peu à peu une méthodologie plus rationnelle s'est développée en ayant une approche logique d'analyse des symptômes. Enfin, les progrès de la science ont permis une approche rigoureuse de la santé. Aujourd'hui, nous sommes dans cette phase scientifique de la médecine et de la pharmacie.

Cette phase peut également être découpée en plusieurs périodes. Depuis des années, l'industrie pharmaceutique s'appuie en majorité sur des molécules chimiques pour soigner les patients. Cependant ces dernières années s'est développé une nouvelle classe de médicaments, les médicaments biologiques. Ces médicaments issus des biotechnologies contiennent une substance active d'origine biologique. Les premiers représentants de ces médicaments biologiques sont les vaccins. Ce sont les premiers médicaments biologiques à avoir été commercialisés. Plusieurs classes de médicaments ont suivi notamment les Anticorps thérapeutiques.

Aujourd'hui une nouvelle classe se développe, les médicaments de thérapie génique.

Depuis une dizaine d'années, la thérapie génique est source d'espoir pour de nombreux patients à travers le monde. En effet, la thérapie génique permettrait de modifier les gènes et donc le patrimoine génétique du patient. Ces technologies de thérapie génique permettraient de traiter des pathologies actuellement en impasse thérapeutique.

En premier lieu, il est nécessaire de revenir aux bases de la génétique ainsi qu'à l'historique de la thérapie génique pour comprendre les spécificités de ces traitements.

L'Homme est un organisme pluricellulaire constitué de cellules.

Dans chaque cellule de l'organisme, il y a un noyau qui contient les 46 chromosomes repartis par paires. Ces chromosomes sont constitués d'Acide DesoxyriboNucléique (ADN) et

contiennent chacun plusieurs gènes. Ce sont les gènes qui portent l'information génétique permettant à l'organisme de produire les protéines, responsables de son bon fonctionnement. Entre l'ADN et les protéines, il existe un intermédiaire appelé Acide Ribonucléique messager ARN (ARNm). En effet, dans les cellules, l'ADN est transcrit en ARN messager (ARNm). La transcription permet à l'aide d'enzymes la synthèse d'une molécule d'ARNm à partir d'une molécule d'ADN complémentaire. Cet ARNm, sera ensuite traduit en protéine. Il est donc l'intermédiaire entre l'ADN et les protéines.

L'ARNm, transcrit à partir de l'ADN, est constitué de parties codantes : les exons et de parties non codantes : les introns. Ce sont les exons qui codent pour la protéine correspondante. L'ARNm se débarrasse des parties non codantes de l'ADN et raccorde entre elles les parties codantes les exons.

Une fois cela fait, l'ARNm est ensuite traduit en protéine fonctionnelle. La figure 1 résume la production des protéines :

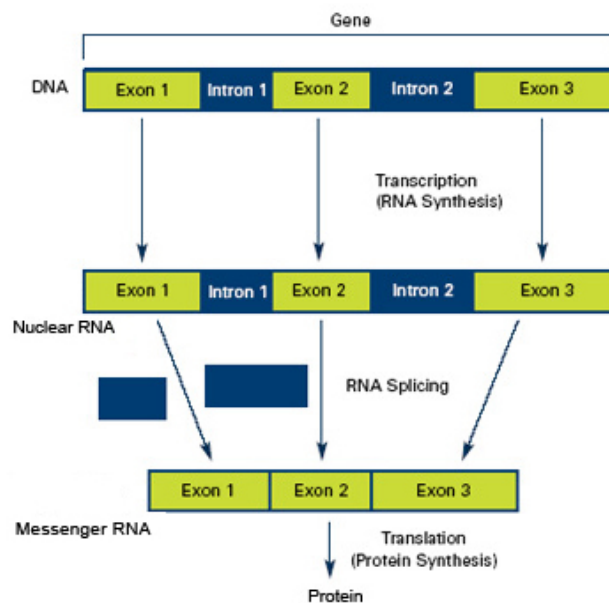


Figure 1 : Schéma simplifié de la Biologie Moléculaire¹

La thérapie génique agit sur cette voie pour influencer la production de protéines.

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique (acide nucléique) dans des cellules pour soigner une maladie. Par acide nucléique, nous entendons donc ADN ou ARN. Nous verrons plus tard dans le rapport des techniques de thérapie génique qui agissent sur les ARNm ou ADN pour influencer la production de protéines d'intérêt.

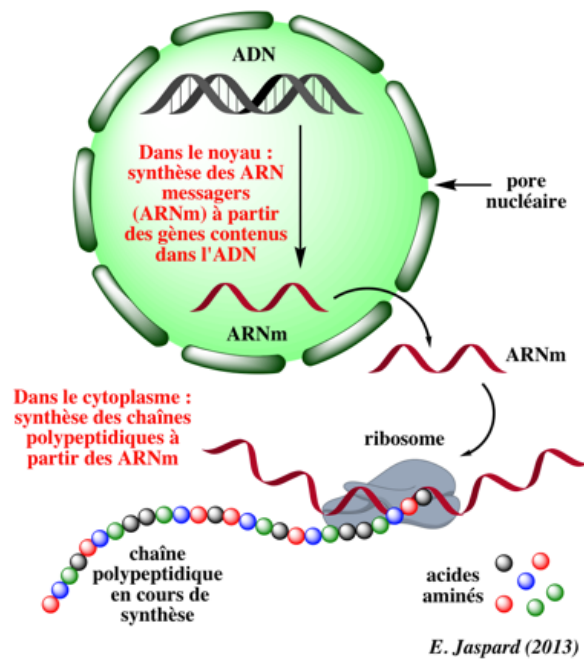


Figure 2 : Représentation des étapes de l'ADN aux protéines ²

Il existe en premier lieu deux grands types de thérapie génique : les thérapies géniques somatiques et les thérapies géniques germinales³.

Les thérapies géniques somatiques touchent les cellules somatiques du patient et ne se transmettent donc pas à la descendance.

La thérapie génique germinale touche les cellules germinales. Lorsque la thérapie génique modifie le patrimoine génétique des cellules germinales, les modifications se transmettent à la descendance.

Cela pose des problèmes éthiques très importants et de ce fait la thérapie génique germinale est interdite en France⁴. Dans ce travail, nous considérons uniquement la thérapie génique somatique. Nous noterons cependant que même si les modifications génétiques ne se transmettent pas à la descendance, la thérapie génique somatique pose également des questions d'éthique.

Dès 1990, le comité consultatif national d'éthique a rendu un avis concernant la thérapie génique chez l'Homme¹²³. Cet avis insiste sur le caractère particulier de cette technologie. Il émet un avis favorable à l'utilisation de la thérapie génique uniquement concernant les cellules somatiques. Il interdit toutes les thérapies géniques concernant les cellules germinales.

En ne considérant que la thérapie génique somatique, deux grandes stratégies sont utilisées⁵:

- La thérapie génique *in vivo* : Dans cette stratégie, l'acide nucléique est transféré directement au patient à l'aide de vecteurs. Le vecteur est le véhicule de l'acide nucléique lui permettant d'atteindre les cellules d'intérêt.
- la thérapie génique *ex vivo* : Ici, les cellules du patients sont prélevées, puis modifiées à l'aide d'acide nucléique puis réinjectées.

Le travail proposé ici se concentre sur la thérapie génique *in vivo*. Évidemment certains éléments présentés pourront s'appliquer aux deux stratégies.

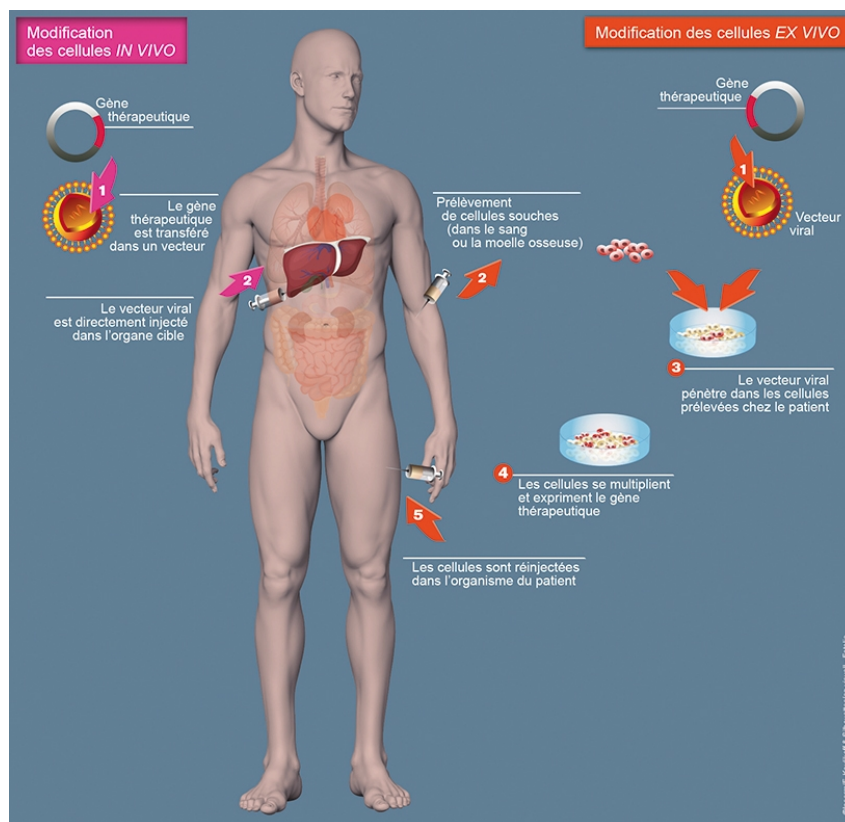


Figure 3 : Les deux principales stratégies de thérapie génique⁵

L'idée de traiter des pathologies en modifiant les gènes n'est pas récente. Dans les années 50, les scientifiques évoquent l'idée de modifier le patrimoine génétique¹²⁵. Friedmann et Roblin sont les premiers à évoquer l'immense potentiel qu'est la thérapie génique dans la revue scientifique « Science » en 1972¹²⁴. Ils déclarent que « la thérapie génique peut améliorer des maladies génétiques humaines dans le futur ». Cependant, à cette époque les techniques et les connaissances n'étaient pas assez développées.

Environ 20 ans plus tard, le premier essai clinique de thérapie génique chez l'Homme fût approuvé par les autorités. Il s'agit d'une injection de lymphocytes T génétiquement modifiés chez des patients atteints de cancer.

En 1999, le décès de Jesse Gelsinger lors d'un essai clinique de thérapie génique pousse les autorités à durcir la réglementation et les autorisations d'essais cliniques. Le décès est dû à une réaction immunitaire du patient contre le vecteur viral.

Le premier succès thérapeutique de thérapie génique intervient au début des années 2000 avec l'utilisation de thérapie génique chez des enfants atteints d'immunodéficiences combinées sévères (SCID X1 et ADA-SCID).

Malheureusement ces traitements furent responsables de sévères effets indésirables et notamment de leucémie. Ces effets indésirables étaient ici aussi causés par le vecteur viral utilisé. Nous verrons en détail les vecteurs dans une prochaine partie. En effet les vecteurs sont un outil indispensable à la thérapie génique in-vivo. Nous verrons qu'il en existe de nombreux avec des caractéristiques différentes.

Après des années de tests, le premier médicament de thérapie génique in vivo autorisé en Europe est le Glybera en 2012. Nous verrons dans le détail plus loin dans le rapport l'état du marché de la thérapie génique.

Aujourd'hui les progrès de la science dans les vecteurs notamment ont permis de réduire les risques et de faire de la thérapie génique une des thérapeutiques prometteuses pour de nombreuses pathologies aujourd'hui en impasse thérapeutique.

Il y a aujourd'hui de nombreux essais cliniques traitant de thérapie génique en cours. Des produits sont également commercialisés. Nous verrons en détail ces produits dans la dernière partie de la thèse.

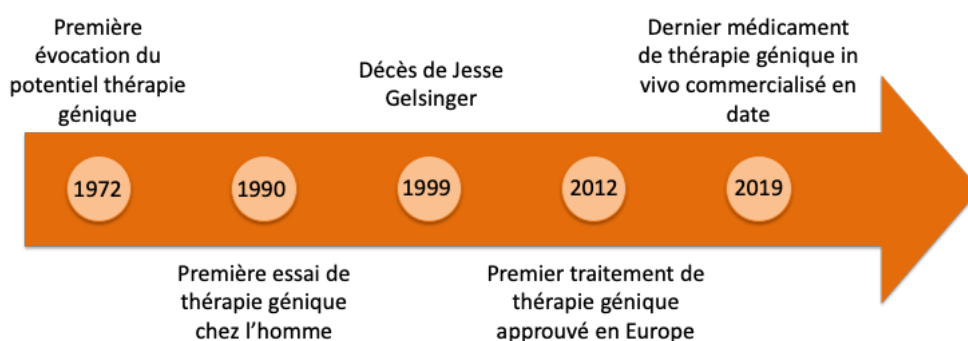


Figure 4 : Histoire simplifiée de la thérapie génique

Pour être persuadé que la thérapie génique est devenue au fil des années incontournable il suffit de regarder l'évolution du nombre de publications par année. Nous voyons très clairement une augmentation du nombre de publications scientifiques jusqu'à nos jours.

Cette analyse des publications confirme que la thérapie génique est en plein essor. Elle ouvre la voie à la guérison de maladies jusqu'à présent en impasse thérapeutique.

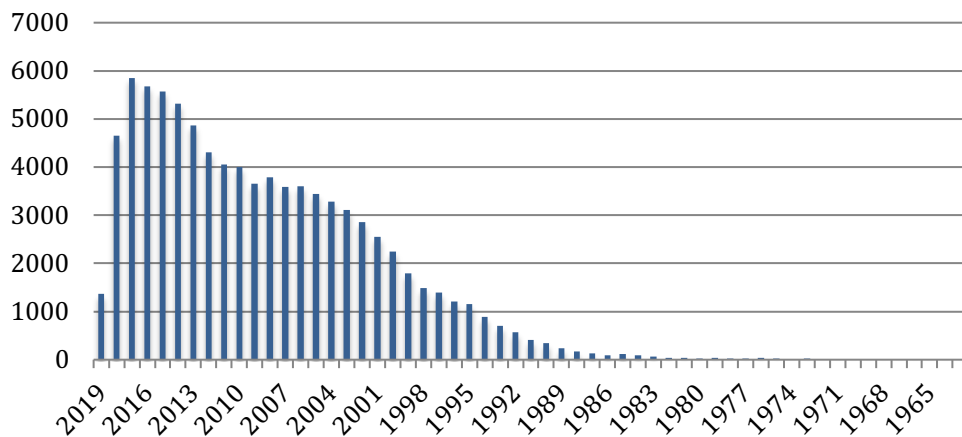


Figure 5 : Evolution de nombre de publication concernant la thérapie génique⁶

Dans ce travail nous proposons un état de l'art de la thérapie génique in vivo.

Dans la première partie, nous traiterons l'aspect réglementaire particulier des médicaments de thérapie génique. Nous verrons notamment les spécificités dans le développement du médicament et dans sa mise sur le marché.

Dans la partie suivante nous étudierons les technologies qui font de la thérapie génique un espoir thérapeutique pour de nombreuses maladies.

Nous étudierons enfin le marché actuel de la thérapie génique ainsi que les limites bloquant le développement de la thérapie génique in vivo.

II- Les spécificités de la réglementation de la thérapie génique

Les médicaments de thérapie génique sont des médicaments particuliers. En effet, il s'agit de médicaments biologiques permettant de modifier le matériel génétique. Ils sont associés à des risques importants. De plus ils s'appuient sur des techniques extrêmement récentes sur lesquelles nous avons peu de recul.

Pour toutes ces raisons, les médicaments de thérapie génique possèdent une réglementation spécifique. Cette réglementation s'appuie sur la réglementation générale des autres médicaments tout en apportant des spécificités importantes.

Nous allons étudier le cadre réglementaire des médicaments de thérapie génique.

A- Les médicaments de thérapie génique dans les médicaments de thérapie innovante

La thérapie génique fait partie d'une classe particulière de médicament appelée médicaments de thérapie innovante.

L'appellation Médicaments de thérapie innovante (MTI) apparaît en 2007. En effet, les spécificités relatives à ce type de médicaments poussent les autorités à créer une catégorie de traitements à part entière. Ce nouveau statut crée un cadre réglementaire spécifique.

Les MTI sont régulés au niveau européen conformément au règlement 1394/2007.

Le règlement européen (CE) n°1394/2007 sur les médicaments de thérapie innovante a considérablement modifié l'environnement réglementaire applicable aux approches thérapeutiques qui font appel aux gènes, tissus ou cellules. Il est entré en vigueur le 30 décembre 2008.⁷

Ce règlement considère qu'à la vue des récents progrès technologiques dans les biotechnologies, les traitements qui en découlent ne peuvent être considérés comme des médicaments « classiques » à usage humain.

En effet, il est dit qu'« En raison de la nouveauté, de la complexité et de la spécificité technique des médicaments de thérapie innovante, des règles harmonisées adéquates sont nécessaires pour

assurer leur libre circulation dans la Communauté et le bon fonctionnement du marché intérieur dans le secteur de la biotechnologie. » règlement européen 1394/2007.

Ainsi ce règlement confirme le statut de médicament, spécialité pharmaceutique, aux produits de thérapie génique, cellulaire, de l'ingénierie tissulaire et des produits combinant dispositifs médicaux et cellules ou tissus. Il est une *lex specialis* : ses dispositions complètent les dispositions générales, de la Directive 2001/83/CE. Elles instituent un code communautaire pour les médicaments à usage humain.

Pour les médicaments MTI ou advanced therapy medicinal product (ATMP) en anglais, la Directive 1394/2007 complète la Directive concernant les médicaments à usage humain 2001/83/CE⁸.

Le règlement européen en plus des MTI crée deux autres catégories⁹ :

- Les Médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement : Ils ne dépendent pas de la Directive 1394/2007 car ils sont préparés de façon ponctuelle, selon des normes de qualité spécifique et utilisés au sein d'un même état membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé. Article L. 5121-1 du Code de la Santé Publique
- Les préparations cellulaires : elles ne sont pas des MTI car
 - o Ne sont pas modifiées de façon substantielle
 - o Sont destinées à être utilisées pour la même fonction essentielle chez le donneur et le receveur

Ces deux catégories possèdent un cadre réglementaire spécifique qui ne sera pas étudié ici. Seuls les médicaments de thérapie innovante (MTI) seront étudiés et plus précisément les médicaments de thérapie génique.

En annexe, sera présenté un tableau récapitulant les principales différences réglementaires entre MTI, MTI-PP et préparation.

Plusieurs types de médicaments MTI sont définis au niveau européen notamment par la Directive 2001/83/CE :

- Les médicaments de "thérapie génique" :

« Un médicament de thérapie génique est un médicament biologique.

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- a) sa substance active contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique

Et

- b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence. »

- Les médicaments de "thérapie cellulaire somatique" :

Un médicament de thérapie cellulaire somatique est un médicament biologique.

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- a) il contient ou consiste en :
 - des cellules, tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle pour en modifier les caractéristiques biologiques, fonctions physiologiques ou propriétés structurelles,
 - ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur

Et

- b) Il est présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, prévenir ou diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective.

- Les médicaments "issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire"

Sont considérés comme "tissus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire " les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :

- a) les cellules ou tissus ont été soumis à une **manipulation substantielle**, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés

structurelles **utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés.**

- b) les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur

- Les médicaments "combinés de thérapie innovante"

Ces médicaments de thérapie innovante (médicaments de thérapie cellulaire, thérapie génique ou d'ingénierie tissulaire) intègrent dans leur composition :

- un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la Directive 93/42/CEE,
- ou bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point c), de la Directive 90/385/CEE,
Et
- leur partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables,
Ou
- leur partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités.

La thèse se concentre uniquement sur la thérapie génique. Les autres types de MTI ne seront pas abordés. Cependant certaines informations notamment réglementaires pourront s'appliquer également aux autres types de MTI.

Pour aider à la classification des médicaments dans une ou l'autre des catégories, un arbre décisionnel a été créé par l'European Medicines Agency (EMA) pour aider à caractériser en thérapie génique les médicaments de thérapie innovante.¹⁰ (Annexe 1)

Cette classification particulière des médicaments de thérapie génique entraîne des spécificités dans le processus de développement de ce type de médicaments. En effet, cette classe de médicament particulier nécessite certaines spécificités dans le processus de développement pour permettre aux autorités d'évaluer le candidat médicament dans l'objectif d'accorder l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et de d'assurer une sécurité optimale aux patients concernés.

B- Le processus de développement d'un médicament de thérapie génique

Les grandes étapes de développement d'un médicament classique concernent également les médicaments de thérapie génique¹¹ :

- La phase préclinique : permet de tester le candidat médicament sur des cellules en culture (*in vitro*) et chez l'animal (*in vivo*).
- La phase clinique permet de passer chez l'Homme, pour tester la molécule chez des personnes saines, puis évaluer sa sécurité et son intérêt chez des malades.

1- La phase préclinique

Les études précliniques apportent les données préliminaires sur le comportement d'une molécule dans des cellules mises en culture et au sein d'organismes animaux vivants. Elles sont indispensables à tout développement de médicaments. L'objectif est d'obtenir des données concernant la sécurité et l'efficacité du traitement avant une utilisation chez l'Homme. Toutes les données nécessaires sont parfaitement décrites dans des lignes directrices (guidelines) nationales ou communautaires.

Il est d'abord nécessaire de préciser, que dans le cadre de la thérapie génique, l'effet thérapeutique dépend du vecteur ou système de délivrance ainsi que du produit du gène. De ce fait, l'étude non clinique doit étudier ces deux aspects entraînant une gestion particulière des données précliniques à générer. Les spécificités relatives aux données à générer lors du développement seront étudiées plus tard dans le rapport.

Le choix des animaux ou modèles cellulaires utilisés lors des études précliniques doit être justifié et expliqué aux autorités réglementaires.

Pour des raisons de bien être animalier, des outils de cultures cellulaires ainsi que des outils bio-informatiques pourront réduire à l'avenir l'utilisation d'animaux.

De par la complexité des modes d'action des médicaments MTI et des thérapies géniques, les études précliniques jouent un rôle important dans le développement des MTI dans le but de réduire les risques liés aux études cliniques chez l'homme que nous allons étudier dans la prochaine partie.

Une fois que les données non cliniques ont été générées, la société développant le produit demande une autorisation d'essai clinique auprès de l'agence réglementaire. L'autorisation est donnée notamment sur la base des données non cliniques.

2- La phase clinique

Lorsque les données précliniques sont obtenues, la société développant le produit fait une demande d'autorisation d'essai clinique. L'objectif est d'évaluer la sécurité du médicament et son efficacité chez des volontaires sains puis malades.

Au vu des risques encourus lors de l'utilisation de thérapie génique, les autorités ont créé un cadre réglementaire spécifique pour la demande d'autorisation des essais cliniques pour les MTI.

Selon le Règlement (UE) No 536/2014, relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain, une étude clinique est destinée à :¹²

- « à mettre en évidence ou à vérifier les effets cliniques, pharmacologiques ou les autres effets pharmacodynamiques d'un ou de plusieurs médicaments;
 - à identifier tout effet indésirable d'un ou de plusieurs médicaments; ou
 - à étudier l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion d'un ou de plusieurs médicaments;
- dans le but de s'assurer de la sécurité et/ou de l'efficacité de ces médicaments; »

Les essais cliniques sont généralement découpés en 3 phases¹³ :

- Les **essais cliniques de phase I** correspondent le plus souvent à la première administration d'un médicament chez l'Homme. Ils sont menés en règle générale sur un nombre limité de sujets sains. Les principaux objectifs sont de vérifier que le nouveau médicament ne présente aucun problème de sécurité majeur et d'acquiescer des preuves préliminaires démontrant qu'il pourrait présenter une réelle valeur thérapeutique ou prévenir la maladie
- Les **essais cliniques de phase II** sont réalisés sur des sujets malades. L'objectif est de démontrer l'efficacité du traitement et la posologie appropriée.
- Les **essais cliniques de phase III** sont menés sur une large population de malades semblable à la population cible. Les principaux objectifs sont de démontrer l'innocuité

et l'efficacité du nouveau médicament et de comparer les résultats aux résultats obtenus avec des traitements existants.

En France l'essai clinique doit suivre les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC). Les BPC correspondent à un ensemble de dispositions à mettre en place pour assurer à des essais la qualité et l'authenticité de leurs données scientifiques d'une part, et le respect de l'éthique d'autre part.

Avant de débiter un essai clinique, le développeur du produit doit obtenir une autorisation par les autorités réglementaires. Les autorisations d'essai clinique sont réglementées et délivrées par les autorités réglementaires.

Nouveau cadre réglementaire européen

Le cadre réglementaire des essais cliniques est en mutation. En effet, un nouveau Règlement européen est mis en place et abroge le précédent.

Le Règlement 536/2014, définit le principe général d'un essai clinique. Il abroge la Directive 2001/20/CE. Un Règlement est un acte juridique de l'Union, obligatoire dans tous ses éléments dès son entrée en vigueur.

Il est imposable à tous les états membres dont la France. Il s'applique à tous types de médicaments y compris les MTI.

Un essai clinique ne peut être conduit que :

« a) si les droits, la sécurité, la dignité et le bien-être des participants sont protégés et priment tout autre intérêt; et

b) s'il a pour but de produire des données fiables et robustes. »

De plus ce Règlement stipule que pour être autorisé un essai clinique doit être soumis à une analyse scientifique et éthique.

Cependant, l'entrée en vigueur de ce Règlement est dépendante de la mise en marche de la plateforme internet permettant de centraliser les demandes. Cette plateforme, le Système d'information sur les essais cliniques (CTIS), contiendra le portail et la base de données centralisées de l'UE pour les essais cliniques prévus par le Règlement. Le CTIS sera le point d'entrée unique pour la soumission des informations sur les essais cliniques dans l'UE.²⁴

Initialement, était prévu un calendrier permettant d'aboutir à une entrée en vigueur du nouveau Règlement en 2018. Pour éviter les changements trop brutaux, l'EMA avait prévu que la Directive précédente 2001/20/CE soit applicable jusqu'en 2021²⁵.

Cependant, ce calendrier prévisionnel a pris du retard. En effet, la dernière communication de l'EMA à ce sujet en décembre 2019 stipule que l'audit final permettant de vérifier toutes les fonctionnalités de ce portail unique devrait débuter en décembre 2020.²⁶

La mise en place de cette nouvelle réglementation n'est donc pas encore faite. Selon le calendrier prévisionnel, la précédente réglementation devait rester en vigueur jusqu'à 2021. Avec ce retard, nous pouvons penser que l'ancienne réglementation sera encore en vigueur jusqu'en 2024-2025.

De ce fait, nous allons étudier dans cette partie les grandes lignes de la nouvelle réglementation européenne avant de se concentrer sur la réglementation actuellement en place en France.

La première étape de ce nouveau Règlement consiste à déposer le dossier de demande d'autorisation d'essais clinique sur un portail européen unique par le promoteur.

Le promoteur d'un essai clinique est la personne physique ou morale qui prend l'initiative de l'essai clinique. Il est à distinguer de l'investigateur de l'essai clinique qui lui est la personne qui dirige et surveille la réalisation de l'essai clinique¹⁴.

Le dossier de demande d'essai clinique comporte deux parties, une partie scientifique (partie 1) et une partie éthique (partie 2) concernant les participants¹⁵. Ces deux parties seront évaluées par les autorités.

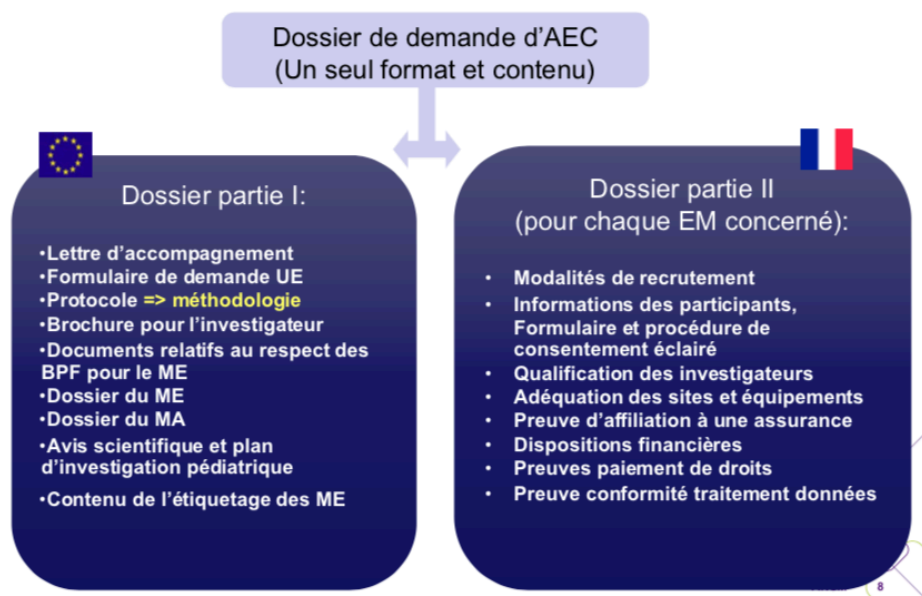


Figure 6 : Demande d'autorisation d'essai clinique Européen

La procédure est ici simplifiée avec trois étapes :

- La validation de la demande
- L'évaluation de la demande
- La décision finale

Si l'essai clinique se déroule dans un seul état membre, cet état devient état rapporteur. Cet état rapporteur sera chargé d'évaluer la demande.

Si l'essai se déroule dans plusieurs pays, un état rapporteur est nommé. Le promoteur peut proposer un état membre rapporteur.

La seconde étape correspond à l'évaluation.

L'évaluation se fait en deux parties (les deux parties du dossier). L'évaluation de la partie une scientifique se fait de manière coordonnée entre les états membres si plusieurs états sont concernés.

Dans ce cas, l'état rapporteur évalue initialement la demande, puis sur la base de l'évaluation initiale, les autres états membres examinent la demande. A la fin, l'état membre rapporteur rédige le rapport final et le transmet aux autres états membres.

Si un seul état membre est concerné, il évalue seul la partie I.

L'évaluation éthique (partie II) concernant la sécurité des participants est faite à l'échelle nationale, et ce quelque soit le nombre de pays impliqués dans l'essai clinique. Elle est faite par un comité d'éthique.

La décision finale est rendue à l'échelle nationale.

Pour une demande concernant un médicament « classique » (hors MTI), sans aller-retour entre le promoteur et l'agence, le délai est de 60 jours. En cas de questions des autorités le délai peut s'étendre jusqu'à 106 jours.

Dans le cas des MTI, l'évaluation demande plus de temps. En effet, du fait du caractère innovant, des avis complémentaires sont nécessaires. De ce fait, la demande est allongée à 110 jours. Ici aussi, en cas de questions elle peut aller jusqu'à 156 jours.

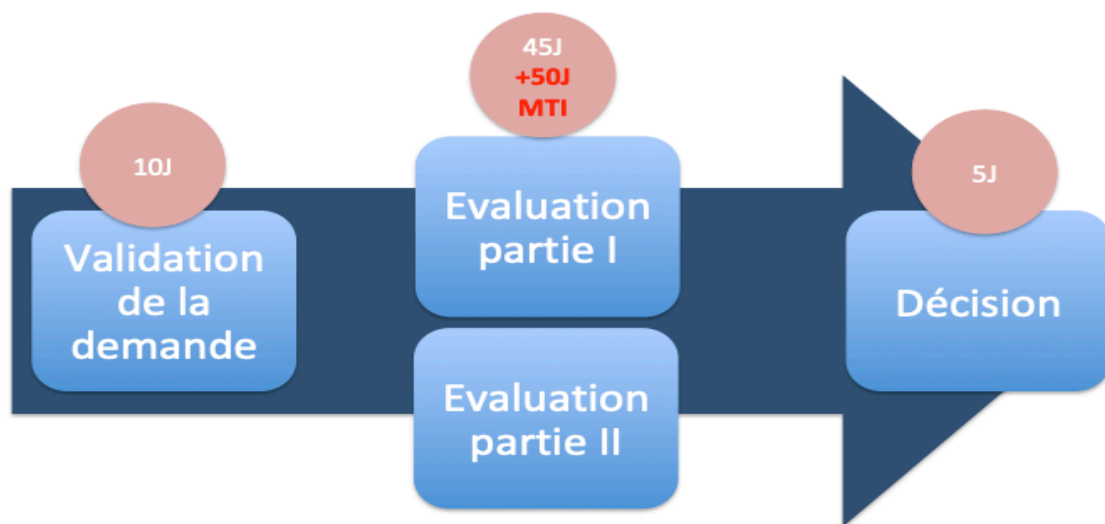


Figure 7 : Délais d'une demande d'autorisation d'essai clinique européen sans questions

Réglementation actuelle – Cas de la France

Comme nous l'avons vu la nouvelle réglementation n'est pas encore en vigueur. L'ancienne réglementation se base sur la directive 2001/20/CE. Cette directive européenne est transposable en lois nationales.

En France, le décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 d'application de la loi n° 2012-300¹⁸ du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (dite loi Jardé) pose le cadre de la réglementation.

Ce décret précise les modalités de réalisation des recherches impliquant la personne humaine (RIPH). Il précise notamment les procédures de demande d'avis au CPP et d'autorisation à l'ANSM, ainsi que les règles applicables en matière de vigilance.

D'un point de vue général, pour être autorisé en France, un essai clinique a besoin de l'autorisation de l'ANSM ainsi que de l'avis favorable du comité de protection des personnes.¹⁷

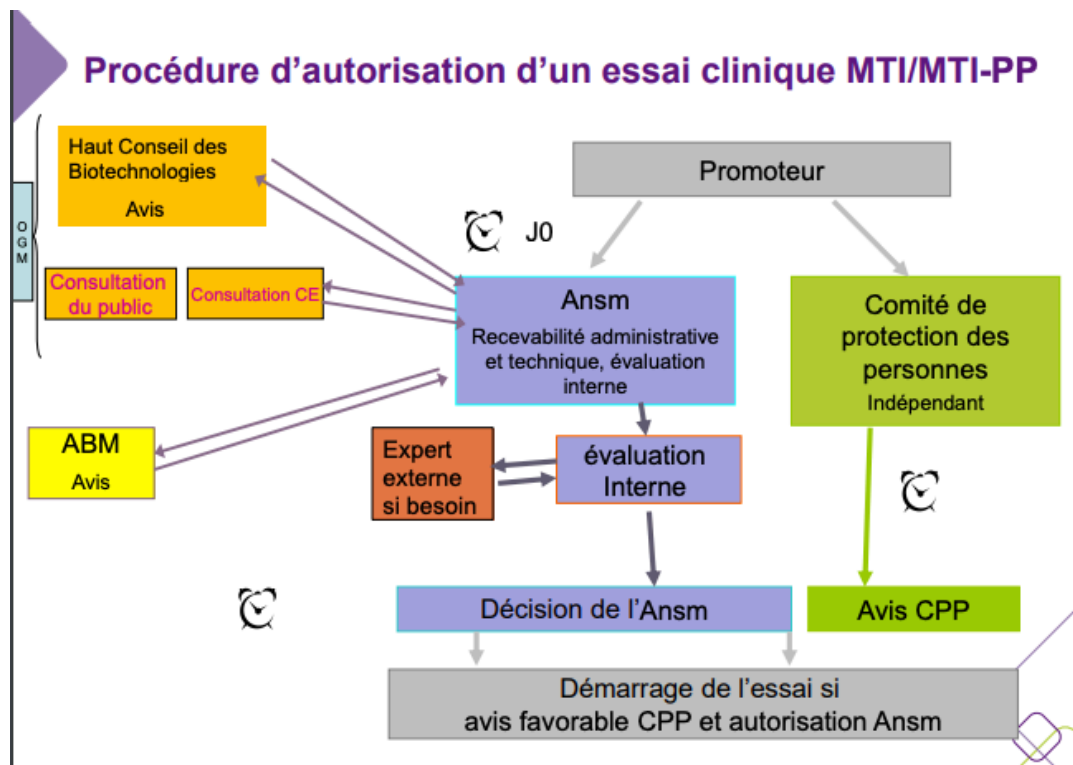


Figure 8 : Procédure d'autorisation d'un essai clinique MTI en France¹²²

Avis du Comité de Protection des Personnes

Les articles *R. 1123-1 à 1123-19* du code de la santé publique contiennent des dispositions qui réglementent l'activité et le fonctionnement des comités de protection des personnes.¹⁹

Il comporte des dispositions relatives :

- aux conditions d'agrément des CPP ;
- à la composition et la nomination des membres des CPP ;
- à l'organisation et au fonctionnement des CPP

Le CPP est formé de deux collègues

Premier collège	Second collège
<ul style="list-style-type: none"> • 4 personnes ayant une qualification et une expérience approfondie en matière de recherche biomédicale dont au moins deux médecins et une personne qualifiée en raison de sa compétence en matière de bio statistique ou d'épidémiologie ; • un médecin généraliste ; • un pharmacien hospitalier ; • un infirmier. 	<ul style="list-style-type: none"> • une personne qualifiée en raison de sa compétence en matière d'éthique ; • un psychologue ; • un travailleur social ; • deux personnes qualifiées en raison de leur compétence en matière juridique ; • deux représentants des associations agréées de malades et d'usagers du système de santé.

Les CPP se prononcent sur les conditions dans lesquelles le promoteur de la recherche assure la protection des personnes et notamment des participants, sur le bien-fondé et la pertinence du projet de recherche et sur sa qualité méthodologique. L'avis favorable d'un CPP est indispensable, en plus de l'autorisation de l'Agence nationale du médicament et des produits de santé (ANSM), pour pouvoir commencer une recherche.²¹

Autorisation de l'ANSM

La deuxième condition sine qua none à l'autorisation d'un essai clinique est l'autorisation de l'agence réglementaire nationale, l'ANSM.

Cependant, du fait du caractère particulier des médicaments de thérapie génique, la demande d'autorisation d'essai clinique possède quelques spécificités.

En effet, certains médicaments de thérapie innovante et donc certains médicaments de thérapie génique peuvent être qualifiés d'Organisme Génétiquement Modifié (OGM). Selon la Directive 2001/18/CE, un OGM est « un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ». ¹²⁶

Les thérapies géniques in vivo peuvent utiliser des vecteurs viraux pour transférer l'acide nucléique au patient. La thérapie génique peut donc dans certains cas nécessiter d'utiliser des OGM.

Pour les MTI qualifiés d'OGM, deux avis du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) sont requis :

- l'avis de classement du produit de thérapie génique et mesure de confinement à mettre en œuvre pour sa manipulation. L'avis de classement de l'OGM vise à estimer le niveau de dangerosité de l'OGM, objet de la recherche²⁰.

Ce premier avis est sollicité par le promoteur de l'essai. Il doit précéder la demande d'autorisation de l'essai clinique, cet avis étant à joindre au dossier.

- L'agrément des sites impliqués dans l'essai clinique et durée des mesures de confinement à laquelle le patient devra être soumis après inoculation du produit de thérapie génique.

Ce deuxième est sollicité directement par l'ANSM lors de l'évaluation du dossier d'essai clinique.

Créé par le décret 2008-1273 du 5 décembre 2008 relatif aux organismes génétiquement modifiés (OGM)¹²⁷, le Haut Conseil des biotechnologies est une instance indépendante chargée d'éclairer la décision publique.

Placé auprès des ministères chargés de l'Environnement, de l'Agriculture, de la Recherche, de la Santé et de la Consommation, il rend des avis sur toutes questions intéressant les biotechnologies, notamment les organismes génétiquement modifiés (OGM)

Dans le cas d'un médicament de thérapie génique, le HCB va juger la dangerosité de l'OGM faisant l'objet de la recherche. Il va rendre des avis à l'ANSM quant à l'autorisation et aux conditions d'autorisation de l'essai clinique. Ces avis se basent sur une évaluation des risques potentiels environnementaux et sanitaires du produit et de l'essai.

L'ANSM se base sur le HCB dans le cas d'OGM. Mais qu'il s'agisse d'OGM ou non, l'ANSM réalise une évaluation interne concernant la sécurité des patients et l'évaluation scientifique du produit (notamment qualité et sécurité des produits utilisés au cours de la recherche, condition d'utilisation). Sur la base de cette évaluation et d'éventuellement des avis du HCB, l'ANSM autorise ou non l'essai clinique.

Selon les articles¹²⁸ R. 1125-8, R. 1125-10, et R. 1125-11 du CSP, dans le cas de médicaments MTI, l'ANSM dispose d'un délai de 90 jours suivant la réception du dossier complet pour autoriser ou non l'essai clinique. En cas de questions, ce délai peut être allongé de 90 jours supplémentaires soit un délai maximum de 180 jours.

Mais dans le cas de thérapie génique contenant des organismes génétiquement modifiés, selon l'article R. 1125-3 du CSP, l'ANSM dispose d'un délai de 120 jours pour se prononcer sur la demande.²²

Cependant, dans l'objectif d'améliorer l'accès aux innovations pour les patients, des initiatives existent pour réduire ce délai.

Accélérer l'accès à l'innovation : Fast track

En France, le délai d'instruction de demande d'autorisation d'essais cliniques est de 180 jours maximum en cas de questions. Mais dans l'objectif d'améliorer l'accès à l'innovation, l'ANSM a mis en place des dispositifs permettant un délai d'évaluation maximum de 110 jours avec questions ou 83 jours sans questions supplémentaires.

Il s'agit des procédures Fast track.¹²⁹

Depuis le 15 octobre 2018, une phase test de deux circuits courts (Fast Track 1 et Fast Track 2) réduit les délais d'instruction des demandes d'autorisation d'essais cliniques de médicaments et permet un accès plus rapide aux patients à des traitements innovants tout en garantissant leur sécurité.

A partir du 18 Février 2019¹³⁰, ce dispositif sera également accessible pour les essais cliniques des médicaments à design complexe et les médicaments de thérapie innovante (MTI) :

- **Fast Trak 1 : Accès à l'innovation**
 - Essais nouveau médicament de design simple ou complexe : délai d'instruction au maximum de 40 jours
 - Essais nouvel MTI innovant : délai d'instruction au maximum de 110 jours

- **Fast Track 2 : Soutien au développement**
 - Nouveaux essais avec un médicament connu : délai d'instruction au maximum de 25 jours

- Nouveaux essais avec un MTI connu : délai d’instruction au maximum de 60 jours

Le Fast track 1 est plus adapté au développement de médicaments de thérapie génique car peu de médicaments de thérapie génique sont sur le marché, les essais concernent des nouveaux médicaments.

Étape	Délais de traitement (en jours calendaires)	Echéances cibles FT1R (par rapport à la date de dépôt)	Livrables
Recevabilité	5 jours	J5	Envoi d'un courrier d'accusé de réception d'un dossier conforme par l'ANSM
Evaluation initiale	78 jours	J83	Envoi de questions motivées par l'ANSM (en cas d'objections)
Réponse promoteur	12 jours maximum	J95	Envoi d'un dossier de réponse par le promoteur
Evaluation finale	15 jours	J110	Notification de la Décision finale par l'ANSM

Figure 9 : Les délais d’une procédure Fast Track²³

Ce dispositif « Fast Track » permet un accès au soin innovant facilité pour les patients. De plus, il permet également de rendre la France attractive en matière d’essais cliniques.

France Biotech s’est réjouie de cette évolution dans l’évaluation d’essais cliniques.

France Biotech est l’association française qui regroupe les principales entreprises innovantes de la santé et leurs partenaires experts.

L’association est optimiste dans le fait que cette nouvelle réglementation entrainera une augmentation du nombre d’essais cliniques sur le territoire.

Si les essais cliniques ont apporté des bénéfices aux patients sans trop d’effets indésirables, la prochaine étape est la mise sur le marché.

Tout médicament commercialisé a nécessairement obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Elle est indispensable à la commercialisation. Les médicaments de thérapie génique n’échappent pas à la règle.

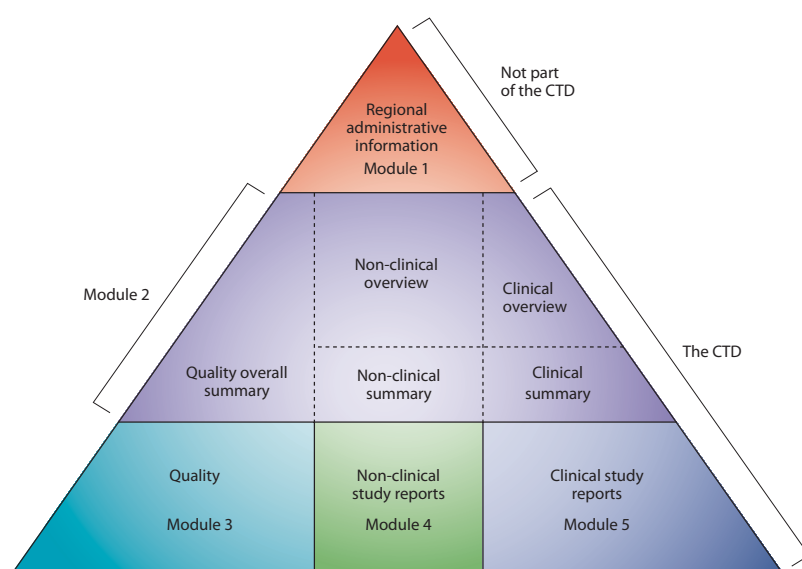
3- Dossier de demande d'AMM

Comme pour tout autre médicament, la demande d'AMM des médicaments de thérapie génique prend la forme du Common Technical Document (CTD). Ce document fournit aux autorités les données permettant d'évaluer le nouveau médicament. L'AMM est donnée sur la base de ce document. La création du CTD a permis une harmonisation des procédures d'autorisation de mise sur le marché.

Le CTD est constitué de 5 modules²⁸ :

- Le module 1 est administratif
- Le module 2 regroupe les Résumés des modules 3, 4 et 5.
- Le module 3 est le module Qualité.
- Le module 4 contient les informations non-cliniques (ou pré-cliniques),
- Le module 5 contient les informations cliniques,

Ce document permet aux autorités règlementaires d'évaluer le candidat médicament en vue d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) :



The CTD triangle. The Common Technical Document is organized into five modules. Module 1 is region specific and modules 2, 3, 4 and 5 are intended to be common for all regions.

Figure 10 : Organisation du Common Technical Document²⁷

La composition du CTD est définie dans la directive 2001/83/CE. Cependant, du fait de spécificités fortes, les médicaments de thérapie innovante et les médicaments de thérapie génique particulièrement ont des exigences règlementaires spécifiques.

Les exigences réglementaires des médicaments de thérapies innovantes sont décrites en partie IV de l'annexe I de la directive 2001/83/CE :

Les exigences spécifiques au **module 3 « qualité »** du CDT mettent en exergue les exigences en termes de traçabilité notamment des matières de départ et les matières premières. Le système de traçabilité doit être complémentaire et compatible avec les exigences établies dans la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil.

Il y est également défini les termes « substance active » et « produit fini ». « Le médicament (produit fini) se compose d'une ou plusieurs séquences d'acide nucléique ou d'un ou plusieurs micro-organismes ou virus génétiquement modifiés, formulés dans leur conditionnement primaire pour l'usage médical prévu. La substance active se compose d'une ou plusieurs séquences d'acide nucléique ou d'un ou plusieurs micro-organismes ou virus génétiquement modifiés. »

La partie IV de l'annexe I met également en évidence les exigences relatives aux médicaments de thérapie génique concernant le **module 4 « préclinique »**. Ces exigences sont appropriées du fait des « propriétés structurelles et biologiques spécifiques et variées des médicaments de thérapie innovante. »

Comme pour tout autre médicament, des tests pharmacologiques doivent être effectués. Ces études prouvant la validité du concept doivent être réalisées sur des animaux et des modèles pertinents. De plus, dès les études précliniques, la sélectivité vis à vis d'une cible pharmacologique doit être évaluée.

La pharmacocinétique devra être également étudiée. Ces tests doivent évaluer la bio distribution dans l'organisme. Du fait du caractère spécial des médicaments de thérapie génique, le risque de transmission à la lignée germinale doit être évaluée.

Enfin, la toxicité du médicament de thérapie génique doit être évaluée. Ces études de toxicité doivent contenir :

- Des études de toxicité par administration réitérée
- La génotoxicité
- La carcinogénicité
- Toxicité pour la reproduction et le développement
- Des études d'intégration
- Des études d'immunogénicité et d'immunotoxicité

Enfin, la partie IV de l'annexe I met en évidence les exigences pour les médicaments de thérapie génique concernant le **module 5 « clinique »** du CTD.

Premièrement, le choix de la dose et le schéma d'administration doivent s'appuyer sur des études de recherche de dose.

« L'efficacité des indications envisagées doit être attestée par les résultats pertinents d'études cliniques utilisant des critères d'évaluation principaux cliniquement pertinents pour l'usage prévu. »

De plus une « une stratégie de suivi à long terme de la sécurité et de l'efficacité doit être incluse dans le plan de gestion du risque. »

Les études cliniques du médicament de thérapie génique doivent porter sur la pharmacocinétique chez l'Homme. Ces études concernent la biodistribution et l'élimination du produit. Elles doivent également étudier le taux d'expression du gène transmis.

Les études de pharmacodynamie doivent « porter sur l'expression et la fonction de la séquence d'acide nucléique après administration du médicament de thérapie génique. »

Enfin la sécurité du traitement doit être certifiée. Ces études doivent permettre d'évaluer les risques d'émergence d'un vecteur compétent pour la réplication, d'émergence de nouvelles souches, de réarrangements de séquences existantes ou de proliférations néoplasiques due à la mutagenèse insertionnelle.

Pour accompagner les laboratoires développant de produits de thérapie génique dans le développement de leurs produits, l'EMA a rédigé une ligne directrice (guideline). La guideline datant du 22 mars 2018¹³¹ « Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products » met en évidence les données nécessaires concernant la qualité, la non clinique et la clinique pour obtenir une AMM.

Procédure de demande d'AMM

Comme le stipule la directive 2001/83/CE, les MTI, comme tout médicament, doivent obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Depuis la création de l'agence européenne du médicament en 1995, il existe plusieurs voies de mise sur le marché. Les principales voies sont la voie nationale et la voie centralisée à l'échelle européenne.

Selon l'Agence nationale de sécurité du médicament, il existe deux grands types de demande d'AMM²⁹ :

<p>Procédures communautaires de demande d'AMM</p>	<p>Ces procédures sont utilisées lorsque le médicament :</p> <ul style="list-style-type: none"> - est innovant - ou destiné à plusieurs Etats membres de la Communauté européenne. <p>Selon le type de procédure communautaire, l'Agence européenne ou le laboratoire choisit respectivement l'Etat rapporteur ou l'Etat référent.</p> <p>L'ANSM est le rapporteur pour la France auprès de l'Agence européenne.</p>
<p>Les demandes de mise sur le marché, limitées au territoire national</p>	<p>Ces demandes sont examinées par l'ANSM.</p> <p>L'ANSM évalue le produit selon des critères scientifiques de qualité, sécurité et efficacité : le nouveau produit doit présenter un rapport bénéfice/risque au moins équivalent à celui des produits déjà commercialisés.</p> <p>Après l'évaluation scientifique, le dossier passe devant les commissions de l'Agence. Trois issues sont possibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - avis favorable - demande de complément d'information - avis non favorable <p>Le directeur général de l'ANSM prend la décision d'autoriser la mise sur le marché.</p>

Pour favoriser l'accès à l'innovation, l'AMM est obligatoirement obtenue dans le cadre d'une procédure centralisée d'autorisation pour les produits innovants dont les MTI. De ce fait, les médicaments de thérapie génique suivent cette procédure.

Dans le cadre d'une procédure centralisée, il y a :

- 1 seule demande (déposée à l'EMA)
- 1 seule évaluation scientifique européenne
- 1 seule AMM qui permet l'accès au marché unique communautaire
- 1 même information (Résumé des Caractéristiques du Produit ; Notice ; Etiquetage)
- 1 seul nom commercial

Elle est délivrée par la commission européenne après évaluation par l'Agence Européenne du Médicament. L'agence européenne du médicament est chargée de l'évaluation scientifique du dossier. La décision finale est prise par la commission européenne en se basant sur le rapport de l'EMA.

L'EMA est constitué de plusieurs comités qui seront consultés selon le produit évalué. Tous ces comités possèdent une expertise scientifique spécifique :³⁰

- Le CHMP : Committee for Human Medicinal Products
- Le CVMP : Committee for Veterinary Medicinal Products
- Le COMP : Committee for Orphan Medicinal Products
- Le CAT : Committee for Advanced Therapies
- Le PRAC : Pharmacovigilance Risk Assessment Committee
- Le HMPC : Committee for Herbal Medicinal Products
- Le PDCO : Paediatric Committee.

Lorsque la demande d'autorisation sur le marché concerne un produit de thérapie génique, les comités consultés sont³¹ :

- Le CHMP (comité des médicaments à usage humain) : Il a pour rôle de préparer l'avis de l'EMA concernant l'évaluation du produit. Cet avis du CHMP est transmis à la commission européenne qui prendra la décision d'octroyer l'AMM ou non.
- Le CAT (comité pour les médicaments innovants) est chargé d'évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité des produits de thérapie innovante et donc des thérapies géniques. La principale responsabilité du comité est de préparer un projet d'avis sur chaque demande d'AMM de MTI, avant que le comité des médicaments à usage humain (CHMP) n'adopte un avis final sur l'autorisation de mise sur le marché du médicament concerné.
- PRAC : Il s'agit du comité d'évaluation des risques en matière de pharmacovigilance. A l'heure actuelle, nous avons peu de recul sur l'efficacité et surtout les risques en matière de thérapie génique. Cela nous impose un suivi important une fois que le produit est commercialisé. Le PRAC est chargé d'évaluer les aspects de la gestion des risques liés aux médicaments à usage humain, notamment :
 - o La détection, l'évaluation, la minimisation et la communication du risque d'effets indésirables
 - o Conception et évaluation d'études de sécurité post-autorisation

- Audit de pharmacovigilance.

Ces trois comités seront impliqués dans l'évaluation du produit.

De plus, au-delà de ces comités, l'EMA possède des « working groups » spécifiques qui seront consultés selon les besoins. Il existe pour la thérapie génique le « Gene Therapy Working Party (GTWP) ». Il possède une expertise scientifique en thérapie génique et pourra fournir des recommandations au CAT et CHMP selon les besoins.

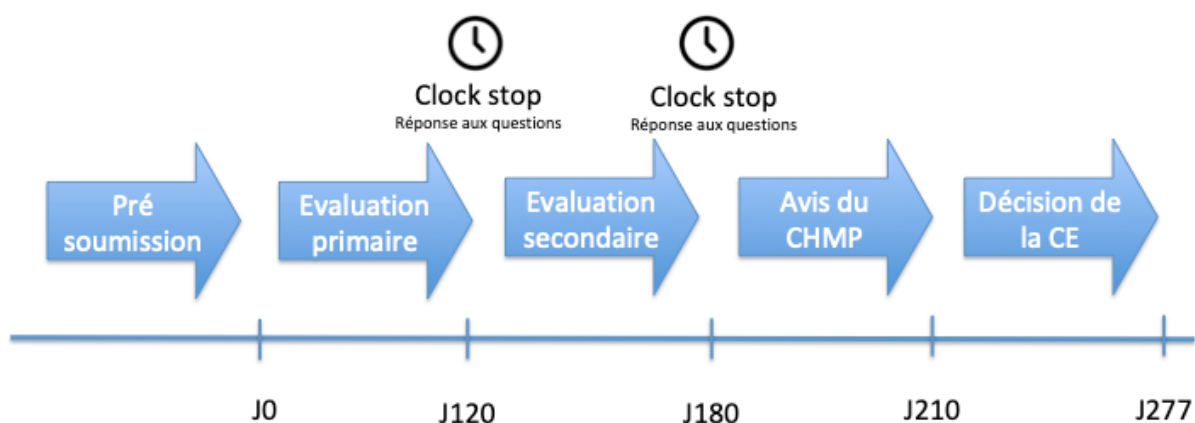


Figure 11 : Calendrier d'évaluation pour une AMM

Le calendrier standard d'une évaluation de mise sur le marché est complexe. Il sera fourni en annexe. (Annexe 2).

Pour simplifier, il y a une première phase de pré-soumission du dossier. Cette phase permet à l'EMA de désigner les états rapporteurs et co-rapporteurs qui évalueront le dossier. Elle permet également au demandeur d'échanger et d'obtenir de l'aide de l'EMA avant l'évaluation du dossier.

Du jour 1 au jour 120, les différents comités évaluent la demande. A j120, le CHMP envoie une série de questions au laboratoire. A ce moment, le « temps s'arrête » pour laisser au développeur le temps de répondre à ces questions. Quand il a terminé, le demandeur envoie ses réponses. A ce moment-là, le calendrier reprend, nous sommes à j121.

De j 121 à j 180, les comités analysent les réponses. A j180 ils transmettent une deuxième liste de questions au développeur. De la même manière, il aura le temps d'y répondre. Une fois qu'il a répondu, le temps reprend à j181.

A j210, le CHMP transmet son avis final à la commission européenne qui prendra la décision définitive de mise sur le marché à j 277.

Aides au développement de médicaments de thérapie génique

Plusieurs dispositifs d'aides au développement des médicaments sont en place au niveau national et européen. Les MTI sont éligibles à ces dispositifs :

Supporting SMEs³²:

L'objectif est ici de promouvoir et de favoriser le développement de médicaments par les petites entreprises. Nous verrons dans la partie « marché et produit » de cette thèse que la thérapie génique est principalement développée par des laboratoires de biotechnologie, voire des équipes académiques, qui n'ont pas les infrastructures des BigPharma.

Ces aides mises en place par l'EMA sont :

- Une assistance réglementaire, administrative et procédurale
- Des aides financières : Réduction de certaines taxes ; exonération de certains frais administratifs
- Une certification des données de qualité / non cliniques pour les études avancées
- Une traduction des documents d'information produit
- Une exonération des frais de licence MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) lors de l'enregistrement sur EudraVigilance.
- Une inscription au registre public des PME

EMA's Innovation Task Force (ITF)³³ :

L'ITF est un groupe multidisciplinaire qui comprend des compétences scientifiques, réglementaires et juridiques. Il a été mis en place pour servir de cadre à un dialogue précoce avec les candidats sur les aspects novateurs du développement des médicaments.

L'objectif de l'ITF est d'établir une plate-forme de discussion pour un dialogue précoce avec les candidats, en particulier les micro, Petites et Moyennes Entreprises (PME), les universitaires et les chercheurs, afin d'identifier de manière proactive les problèmes scientifiques, juridiques et réglementaires des thérapies et technologies innovantes. Ici aussi, il ne s'agit pas d'une initiative spécifique aux laboratoires développant des thérapies géniques mais ils pourront y bénéficier.

Advanced therapy classification³⁴:

Les entreprises peuvent consulter l'EMA pour déterminer si le médicament développé est un médicament de thérapie innovante. La procédure leur permet de recevoir la confirmation qu'un

médicament, basé sur des gènes, des cellules ou des tissus, répond aux critères scientifiques spécifiques d'un MTI.

PRIME³⁵ :

Les thérapies géniques par leurs modes d'actions particuliers permettent de traiter des pathologies en impasse thérapeutiques. A ce titre, elles sont souvent éligibles au programme PRIME de l'EMA. Il s'agit d'un programme visant à soutenir le développement de produits traitant des pathologies en impasse thérapeutique en favorisant les discussions précoces entre l'agence et les laboratoires. Ce dialogue précoce permettra d'accélérer la mise sur marché du produit et donc l'accès à l'innovation pour les patients.

Le programme PRIME permet :

- De favoriser un dialogue précoce avec l'EMA
- D'optimiser le plan de développement du nouveau médicament
- De faciliter notamment le passage de la recherche au développement de médicament.
- D'accélérer l'évaluation du médicament

Orphan designation³⁶ :

Une maladie dite "orpheline" est une maladie pour laquelle aucun traitement efficace n'est disponible. Les maladies orphelines sont à distinguer des maladies rares. Une maladie est dite rare si elle touche moins d'une personne sur deux milles³⁷. Cependant de nombreuses maladies rares sont en impasse thérapeutique et donc déclarées maladies orphelines. La thérapie génique est source d'espoir pour ces pathologies. Certains traitements de thérapie génique ciblent des maladies orphelines et sont donc éligibles à ces initiatives de l'EMA.

Le COMP a pour rôle de donner son avis sur la désignation des médicaments orphelins. Si cet avis est positif, il est ensuite soumis à la Commission européenne, qui prend la décision finale. Un médicament orphelin peut être homologué à tout moment de son élaboration dès lors que sa valeur médicale est démontrée scientifiquement.

Plusieurs initiatives ont été mises en place pour inciter les laboratoires à traiter des pathologies qui ne touchent qu'un nombre restreint de personnes et donc un petit marché.

Les principales incitations mises en place sont :

- Programmes européens et nationaux de subventions pour la R&D
- Réduction du temps de développement clinique

- Réduction du nombre d'inclusions et donc du coût des essais de phase III
- Exonération partielle des redevances sur demande (exonération totale pour les PME)
- Exclusivité commerciale de 10 ans

Scientific advice and protocol assistance³⁸:

L'EMA peut fournir des conseils scientifiques et une assistance sous forme de protocole scientifique aux développeurs de médicaments. Ces conseils permettent d'établir les meilleures façons d'obtenir des données d'efficacité et de sécurité robustes.

Médicaments pédiatriques³⁹ :

L'agence européenne a mis en place plusieurs incitations pour le développement de médicaments pédiatriques. Les thérapies géniques ciblant les enfants sont également éligibles à ces initiatives. Il s'agit ici également d'incitations financières ainsi que d'aides et d'accompagnement pour le développement du produit.

La volonté de développer un produit pédiatrique entraîne la rédaction et la mise en place d'un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) qui déterminent les études que les entreprises doivent réaliser chez l'enfant lors du développement d'un médicament. Ces PIP seront évalués par le PDCO (comité pédiatrique de l'EMA). Un cadre réglementaire européen a été mis en place spécifiquement pour le développement des produits pédiatriques. Nous n'entrerons pas ici dans les détails.

Guidelines :

De nombreuses lignes directrices sont éditées par les autorités réglementaires pour accompagner les entreprises dans les différentes étapes de développement du produit.

Voici les principales guidelines concernant les thérapies géniques in vivo (liste non exhaustive)¹⁶ :

- Guideline on Non-clinical studies required before the first clinical use of gene therapy medicinal products (CHMP/GTWP/125459/06)
- Note for guidance on the Quality, Preclinical and Clinical Aspects of Gene Transfer Medicinal Products (CPMP/BWP/3088/99)
- Guideline on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors (CHMP/BWP/2458/03)

- Guideline on Non-Clinical testing for Inadvertent Germline transmission of Gene Transfer Vectors (EMA/273974/05)
- Guideline on Scientific Requirements for the Environmental Risk Assessment of Gene Therapy Medicinal Products (CHMP/GTWP/125491/06)
- Guideline on Follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products (CHMP/GTWP/60436/07)
- ICH Considerations - Oncolytic Viruses (CHMP/GTWP/607698/08)
- ICH Considerations: General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors (CHMP/ICH/469991/2006)
- ICH Considerations: General principles to address viral / vector shedding (CHMP/ICH/449035/09)
- Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors (CHMP/GTWP/587488/07)
- Guideline on Safety and efficacy follow-up risk management

4- Les mesures post- autorisation de mise sur le marché

Les médicaments de thérapie génique sont des nouveaux médicaments. Nous avons aujourd'hui peu de recul sur leurs utilisations. De plus, les médicaments de thérapie génique peuvent avoir des effets à long terme sur les patients.

Le suivi post-commercialisation est extrêmement important et un enjeu de santé publique. De ce fait, dans le cadre d'une demande d'AMM, le demandeur doit fournir un document détaillant le système de pharmacovigilance qu'il va mettre en place. Ces mesures doivent assurer le suivi de l'efficacité et des effets indésirables une fois le produit sur le marché.

Ce document détaille dans le module 1.8.1 du CTD, le système complet de pharmacovigilance mis en place.

Ce document détaille également dans le module 1.8.2 du CTD la place des activités de pharmacovigilance et de follow-up dans le plan de gestion de risque. En effet, toute demande d'AMM possède un plan de gestion de risque. Ce plan de gestion de risque doit mettre en évidence, l'identification des risques spécifiques au produit développé et les initiatives mises en place pour prévenir et minimiser ces risques identifiés. Ce plan de gestion de risque est mis à jour régulièrement avec les nouvelles données obtenues durant la commercialisation du produit.

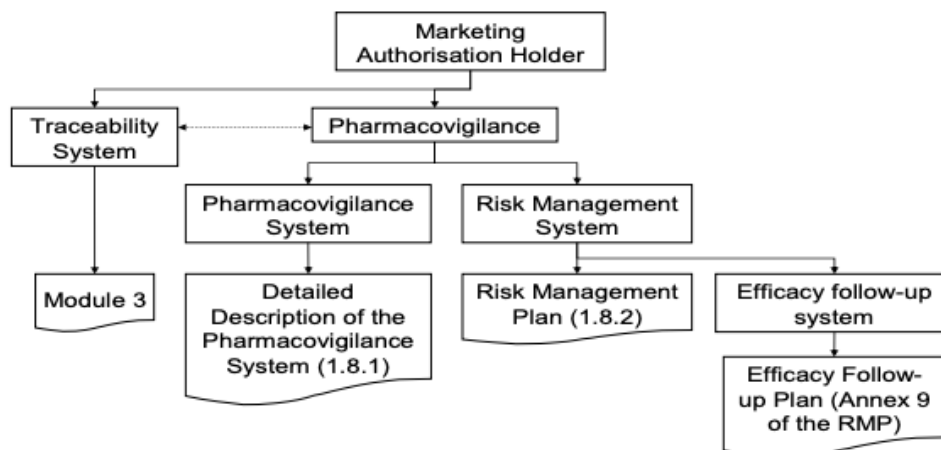


Figure 12 : Système de surveillance post AMM des MTI⁴⁰

C- Les challenges réglementaires au développement des thérapies géniques

Nous venons d'étudier le cadre réglementaire des thérapies géniques. Ce cadre réglementaire est en évolution. Il est à l'heure actuelle une des barrières au développement des thérapies innovantes de demain. En effet, Renske M.T. ten Ham et Al.⁹² ont mené une étude auprès des laboratoires développant des médicaments de thérapie innovante pour connaître leurs principaux challenges dans le développement d'un nouveau médicament. L'aspect réglementaire ressort en première position.

Nous allons voir maintenant quels sont ces challenges.

1- Confirmer et Harmoniser le cadre réglementaire

Ci-dessus, nous nous sommes essentiellement concentrés sur le système réglementaire européen. Le cadre réglementaire Américain ou encore Japonais est différent. Ce manque d'uniformité complique le travail des laboratoires et entraîne un manque d'égalité d'accès au soin pour les patients de par les disparités géographiques et réglementaires d'accès aux médicaments. Il existe également des divergences dans la classification réglementaire des produits qui compliquent la reproductibilité des demandes, notamment de MTI, dans d'autres régions. En effet, il est parfois difficile de classer les nouveaux produits innovants développés.

Une harmonisation doit se faire au sein des régions ICH pour faciliter les démarches réglementaires des développeurs de produits.

La nouvelle réglementation européenne pour les essais cliniques va dans le sens de cette harmonisation et simplification.

De plus, le cadre réglementaire doit être confirmé et suivre les évolutions de ces technologies. Les techniques de thérapie génique sont très récentes et nous verrons dans la prochaine partie qu'elles sont nombreuses et très différentes. Un des défis majeurs pour les agences réglementaires est de suivre l'évolution de ces techniques et d'en adapter le cadre réglementaire.

Il est également difficile pour les autorités réglementaires de trouver des experts sur ces technologies extrêmement innovantes. En effet, il est nécessaire que les personnes en charge de l'évaluation des dossiers soient expertes dans le domaine. Cette difficulté explique notamment la création au niveau européen du CAT et du working group Gene Therapy.

2- Modèle préclinique et clinique

Il est difficile pour les laboratoires de mettre en place des modèles précliniques et cliniques robustes pour un passage dans la population générale.

Les modèles animaux choisis en préclinique doivent être particulièrement explicités. Les pathologies étant particulières, il est difficile de choisir des modèles animaux pertinents.⁹³ Ces données précliniques limitées renforcent l'importance des données cliniques.

En effet, la difficulté pour les laboratoires est de prouver l'efficacité et la sécurité des patients⁹¹. La thérapie génique traite souvent des pathologies rares. Peu de patients sont éligibles à ces traitements. Les essais cliniques concernent alors naturellement peu de patients. Il est difficile pour les laboratoires de mettre en place des essais cliniques qui seront statistiquement significatifs. En ayant peu de patients lors des essais cliniques, la projection dans la population générale est difficile.

De plus, l'efficacité des traitements est souvent comparée à un traitement référence lors des essais cliniques. Les traitements de thérapie géniques sont des traitements particuliers. Il est difficile de les comparer à des références car il n'y a souvent aucun traitement disponible pour les pathologies traitées.

Enfin, la sécurité et l'efficacité à long terme sont difficiles à prouver. Il s'agit de nouveaux traitements pour lesquels nous avons peu de recul.

III- Les technologies de thérapie génique in-vivo

Le développement de la thérapie génique et particulièrement la thérapie génique in vivo s'appuie sur des avancées technologiques qui ont pu lever les barrières qui limitaient le développement des produits. Nous allons voir dans cette partie quels sont les concepts et technologies clés sur lesquels s'appuie la thérapie génique in vivo. Nous verrons ensuite quelles sont les difficultés scientifiques au développement de la thérapie génique.

A-Concepts généraux

Nous avons vu dans la partie précédente la définition réglementaire de la thérapie génique. D'un point de vue plus opérationnel, la thérapie génique consiste en l'administration d'acides nucléiques destinés à traiter une pathologie. Ici nous nous intéresserons à la thérapie génique in-vivo, c'est-à-dire à l'administration d'acides nucléiques directement chez l'homme. Elle s'oppose à la thérapie génique ex vivo qui consiste à modifier le patrimoine génétique d'une cellule ex-vivo pour ensuite réadministrer les cellules modifiées chez l'homme. Évidemment certaines techniques peuvent s'appliquer in vivo et ex vivo.

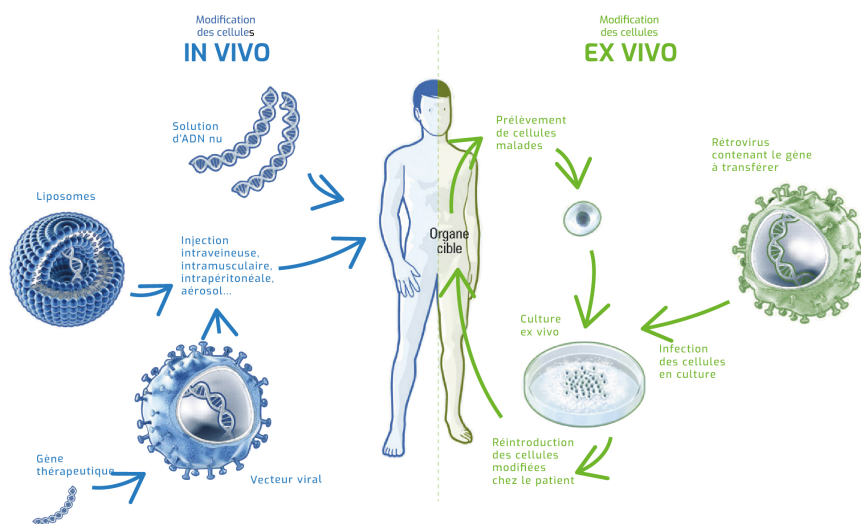


Figure 13 : Les deux voies de la thérapie génique⁴¹

Les thérapies géniques selon qu'elles soient in vivo ou ex vivo, entraînent des difficultés différentes. Nous étudierons principalement les difficultés au développement de la thérapie génique in vivo. La ex vivo sera peu aborder.

Il s'agit de techniques finalement complémentaires et selon la volonté thérapeutique, l'une ou l'autre sera plus intéressante. En effet, il est évident que selon le type cellulaire, la culture ex vivo sera plus ou moins facile. La thérapie ex-vivo n'est pas imaginable pour les cellules nerveuses par exemple alors qu'elle peut être adaptée pour les cellules hématopoïétiques. Selon la pathologie traitée, le choix de la stratégie sera différent.

Naturellement quand on parle de thérapie génique, nous pensons directement au fait de transférer un gène manquant chez les patients. En effet, c'est une utilisation importante et la première à avoir été développée.

Il existe cependant de nombreuses autres technologies. En effet, la thérapie génique peut permettre de supprimer l'expression d'un gène. Différentes techniques que nous verrons plus tard existent pour cette application.

Enfin la dernière possibilité est de modifier la structure du gène. Il s'agit de l'édition du génome ou « gene editing » en anglais. Cette dernière possibilité a ouvert la voie à de nombreux traitements et au développement de technologies de rupture telles que CRISPR/Cas 9 un outil moléculaire permettant d'effectuer des corrections géniques précises).

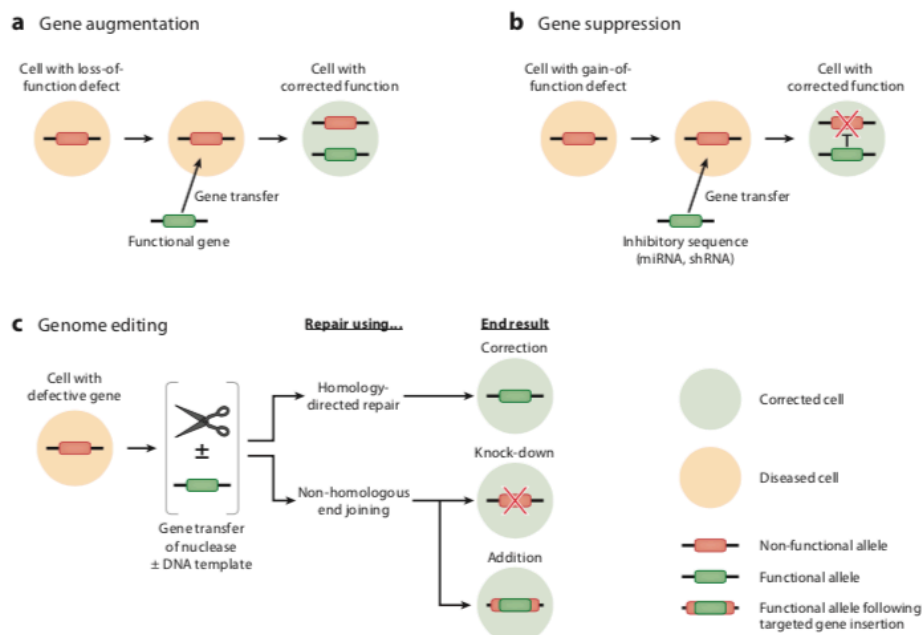


Figure 14 : Les différentes applications des thérapies géniques⁴²

La thérapie génique *in vivo* consiste donc à introduire directement chez les patients des acides nucléiques. Pour introduire l'acide nucléique, les laboratoires utilisent un vecteur. En effet, le gène thérapeutique est introduit dans un vecteur pour être administré chez le patient. Ce vecteur sera le véhicule du traitement. Mais le choix du vecteur est extrêmement important. Il jouera un grand rôle dans l'efficacité et la sécurité du traitement.

En effet, dans une approche *in vivo*, le produit est administré directement chez le patient. Pour que le traitement soit efficace, il doit atteindre les cellules cibles et pour que les effets indésirables soient limités, le traitement ne doit pas atteindre d'autres cellules. Le vecteur a pour mission de véhiculer et protéger le traitement jusqu'aux cellules cibles.

De ce fait, avant de voir les technologies de thérapie génique, nous allons d'abord étudier les différentes catégories de vecteurs.

Le challenge le plus important est de pénétrer dans la cellule. En effet, les acides nucléiques ne sont pas capables de pénétrer seuls dans le cytoplasme de la cellule dans le cas d'ARNm et dans le noyau de la cellule dans le cas d'ADN.⁴³ Les vecteurs viraux sont donc rapidement apparus intéressants du fait qu'ils aient développé des capacités à pénétrer dans les cellules assez exceptionnelles. Cependant, le fait d'utiliser des vecteurs viraux peut entraîner des risques. C'est pourquoi d'autres vecteurs non viraux ont été également développés. Enfin, nous verrons également qu'il est possible d'administrer l'acide nucléique nu.

B- Les Vecteurs

Il existe donc deux grands types de vecteurs, les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Nous allons voir dans un premier temps les vecteurs viraux. Ensuite nous étudierons les vecteurs non viraux.

1- Les vecteurs viraux

Les débuts de la thérapie génique ont été marqués par des accidents liés à l'utilisation de vecteurs viraux qui se sont introduits dans des organes non-cibles, ou qui ont provoqué l'intégration du gène modifié dans des séquences dites «pro-oncogènes» de l'ADN du patient, déclenchant des cancers et décès. Suite à ces accidents, les scientifiques ont développé des vecteurs viraux plus sûrs et plus efficaces de sorte à réduire le risque d'insertion aléatoire dans le génome de l'hôte.

Les Rétrovirus

Le rétrovirus⁴⁴ est un virus de la famille des retroviridae, dont le génome est composé d'ARN. Les rétrovirus ont été les premiers virus utilisés dans la thérapie génique⁴⁵. Les gènes du rétrovirus sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. Les rétrovirus ont été très utilisés car ils ont de nombreux avantages :

- Ils sont capables d'intégrer un grand nombre de cellules
- Les vecteurs à rétrovirus s'intègrent facilement au génome de la cellule. De ce fait, le gène va persister de façon stable.
- Enfin ils ont une faible immunogénicité, ce qui permet de limiter l'activation du système immunitaire et donc de limiter les effets néfastes.

Ils présentent également des limites :

- Ils présentent une limite de capacité de transport. En effet, les rétrovirus peuvent transporter uniquement des gènes limités à 8 kilobases. Ce qui posera naturellement problème pour des gènes plus grands.
- Le rétrovirus s'intègre aux cellules au moment de la division cellulaire. On les appelle donc vecteurs viraux intégratifs car le gène thérapeutique sera transmis aux cellules filles en cas de division cellulaire.
- Le tropisme cellulaire est peu spécifique. Ceci explique une utilisation plus fréquente ex-vivo malgré le fait qu'il a été utilisé in vivo notamment pour des maladies du foie⁴⁶

Le problème majeur dans l'utilisation des rétrovirus est la sécurité. En effet, il s'intègre au hasard dans le génome. En s'intégrant dans des zones responsables de la division cellulaire, ils peuvent entraîner des risques de cancer. Ce risque d'oncogénèse explique pourquoi leur utilisation a diminué au profit d'autres types de vecteurs viraux.

Les Lentivirus

Comme les rétrovirus, les lentivirus appartiennent à la famille des retroviridae. Il s'agit également d'un virus à ARN.

Comme le rétrovirus, il insère le gène thérapeutique dans le génome de la cellule hôte ce qui permet une expression du gène stable au cours du temps.

Cependant, les vecteurs lentiviraux offrent un avantage supplémentaire, à savoir qu'ils peuvent infecter les cellules qui ne sont pas en cours de division. Cette capacité permet aux lentivirus d'avoir un tropisme plus important. Cette capacité permet d'ouvrir des possibilités de traitements à des pathologies concernant des cellules qui ne se divisent pas ou très peu chez l'adulte comme par exemple les neurones ou les cellules pancréatiques.

Les lentivirus présentent cependant des limites pour une utilisation in vivo :

- Comme les rétrovirus, les lentivirus sont limités à des gènes de 8 kilobases.
- L'intégration au génome entraîne des risques importants de mutagenèse.

Le problème d'insertion au génome est une limite importante de ce type de vecteur. Pour pallier à ce problème, les scientifiques se sont tournés vers les adénovirus.

Adénovirus

Les Adénovirus appartiennent à la famille des Adenoviridae. Ils ont un génome constitué d'ADN double brin. Lorsque les virus de cette famille pénètrent dans le noyau de la cellule, le matériel génétique ne s'intègre pas au génome de l'hôte, on dit qu'ils sont non intégratifs. L'ADN persiste donc sous forme d'épisome et il est ensuite transcrit en ARN messager. Cette caractéristique, permet de limiter le risque de cancer par insertion au génome. Ils ont un effet transitoire, en s'exprimant pendant la durée de vie de la cellule et disparaissant avec la mort de celle-ci ce qui fait d'eux le vecteur de choix lorsque qu'une expression de court terme est recherchée.

De plus, les adénovirus ont un tropisme cellulaire important et peuvent infecter plusieurs types de cellules que ces dernières soient en division ou non.

Un autre point positif est qu'ils peuvent transporter des gènes de plus grande taille (jusqu'à 30 kilobases⁴⁷) que les virus intégratifs.

La limite la plus importante à l'utilisation de ce type de virus est l'immunogénicité associée. En effet, les adénovirus entraînent une activation du système immunitaire contre le virus et donc le potentiel traitement. Des recherches sont faites pour modifier le virus et limiter cette immunogénicité. Nous verrons plus tard qu'il s'agit d'une des limites majeures à l'utilisation des vecteurs viraux en thérapie génique in vivo.

Adeno Associated Virus

Un autre type de virus a été utilisé pour pallier aux problèmes précédemment évoqués et notamment l'immunogénicité⁴⁸. En effet, les virus adéno-associés ou Adeno Associated Virus (AAV) ont l'avantage de n'être que peu immunogènes. Ils sont donc naturellement mieux tolérés par l'organisme.

Le tropisme cellulaire des AAV est important. Ils peuvent aussi bien infectés des cellules en division que des cellules qui ne se divisent pas. Cependant, il existe plusieurs sérotypes d'AAV avec une spécificité au niveau des tissus infectés⁴⁹.

L'AAV a la capacité de s'intégrer au génome de l'hôte. Cependant l'insertion se passe quasiment toujours au niveau du chromosome 19 ce qui limite les risques d'insertion au hasard et donc les risques d'oncogénèse.

L'AAV permet une expression à long terme du gène thérapeutique.

La principale limite à l'utilisation des AAV repose dans sa faible capacité de transport limitée à 4,8 kilobases.

Nous venons d'étudier les quatre principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.

D'autres vecteurs existent :

- Le vaccinia virus est un virus de grande taille, enveloppé appartenant à la famille des poxvirus. Il possède un génome d'ADN double brin linéaire d'environ 190 kilobases de long, qui code pour environ 250 gènes
- Les alphavirus ont un génome qui est constitué d'un ARN simple brin sens positif. La longueur totale du génome est comprise entre 11 et 12 kb

	VECTEURS TYPE RÉTROVIRUS	VECTEURS TYPE LENTIVIRUS	VECTEURS TYPE ADÉNOVIRUS	VECTEURS TYPE VIRUS ADÉNO-ASSOCIÉS (AAV)	VECTEURS NON-VIRAUX
Capacités d'emballage	8.0 kb	8.0 kb	30.0 kb	4.8 kb	illimité
Facilité de production	+/-		+/-	difficile	+++++
Intégration dans le génome de l'hôte	Oui	Oui	Non	Rarement (< 10%)	rarement
Tropisme cellulaire	uniquement dans les cellules qui se divisent	Large spectre	Large spectre	Large spectre	Large spectre
Expression dans le temps	Long terme		transitoire	Long terme dans les cellules post-mitotiques	Généralement transitoire
Réponse immunitaire	faible	faible	élevée	Relativement faible	faible
Problèmes de sécurité	mutagène	mutagène	Réponse inflammatoire	aucune	aucune
Transmission dans les cellules germinales	+/-		aucune	+/-	aucune
Avantages	Expression stable dans les cellules filles	Expression stable dans les cellules filles	transfert efficace dans la plupart des tissus	Non pathogénique	Non virulent
Déavantages	S'intègre uniquement dans les cellules qui se divisent et risquent de développer des cancers au moment de l'intégration	risque de développer des cancers au moment de l'intégration	L'enveloppe virale peut induire une forte réaction immunitaire	transfert de petites séquences d'ADN	Assez inefficace concernant la transduction

Figure 15 : Principales caractéristiques des vecteurs viraux

Nous venons de voir que de nombreux vecteurs viraux ont été développés durant les dernières décennies. Cependant, beaucoup de limites apparaissent notamment au niveau de la sécurité et du ciblage des cellules. Des nouvelles approches non virales ont donc été développées.

2- Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non-viraux ont le potentiel de résoudre certaines des limites associées aux vecteurs viraux, en particulier en ce qui concerne la sécurité. Plusieurs techniques non virales ont été développées pour délivrer les acides nucléiques aux cellules d'intérêt.

Des vecteurs à base de lipides et des vecteurs à base de polymères ont été intensivement étudiés chez des animaux et dans des essais cliniques. Il a également été étudié la possibilité d'administrer les acides nucléiques nus. Nous étudierons également les approches physiques de transfection.

Plasmide ADN

La molécule d'ADN peut être administrée au travers d'un plasmide. Un plasmide désigne une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome et non essentielle à la survie de la cellule.

Chaque plasmide contient au moins une séquence d'ADN qui sert d'origine de répllication, ou *ori* (point de départ de répllication de l'ADN), permettant à l'ADN plasmidique d'être dupliqué indépendamment du chromosome, en utilisant la « machinerie » de la cellule hôte. Les plasmides peuvent être circulaires, ou parfois linéaires, présentant une ressemblance superficielle avec les chromosomes eucaryotes⁵⁰. Ils contiennent en général une région contenant des sites d'enzymes de restriction permettant d'insérer des fragments d'ADN, pour le clonage, le séquençage ou l'expression de protéines.

Un plasmide codant pour un gène d'intérêt est une technique qui a été utilisée en thérapie génique *in vivo*. En effet, il s'agit de la méthode d'administration probablement la plus simple⁵¹ car à première vue, cette absence de vecteurs permet de limiter les risques d'immunogénicité et d'intégration au génome.

Cependant, cette approche reste généralement moins efficace que celle utilisant des vecteurs viraux lorsqu'il s'agit de traiter de manière systémique *in vivo*. En effet, avec cette technique il est difficile d'atteindre les cellules d'intérêts :

- Premièrement, du fait de la grande taille de la molécule d'ADN, elle a des difficultés à passer les membranes.
- De plus, la molécule est détruite par les nucléases (enzyme responsable de la dégradation des molécules d'ADN).
- Enfin, la molécule d'ADN est chargée négativement, ce qui l'entraîne à former des complexes dans l'organisme, ce qui joue un rôle sur la pharmacocinétique du produit. Son utilisation est beaucoup plus fréquente *ex vivo*.

Les vecteurs de synthèse

Il existe plusieurs vecteurs non viraux utilisés dans la thérapie génique. Les vecteurs synthétiques comme les vecteurs viraux ont pour but de transférer l'acide nucléique à la cellule cible. Le vecteur protégera l'acide nucléique et interagira avec la cellule pour permettre l'internalisation dans le cytoplasme.

Les vecteurs de synthèse sont généralement chargés positivement pour former des complexes avec l'ADN chargé négativement. Ils en existent des lipidiques qui sont principalement les lipides cationiques⁵². Les méthodes de délivrance lipidique sont très étudiées dans la littérature.⁵³ La toxicité de ce type de vecteur dépend des lipides utilisés⁵⁴. Les nombreux essais réalisés nous permettent d'avoir du recul sur ces techniques et de connaître les structures lipidiques les plus adaptées au transfert d'acide nucléique.

Les vecteurs de synthèse peuvent également être protéiques. Par rapport aux autres méthodes non virales, ils possèdent l'avantage de pouvoir cibler des cellules spécifiques, par interaction entre les protéines du vecteur et les protéines cellulaires.

Ils existent enfin des polymères de synthèse permettant aussi de cibler les cellules d'intérêt. De manière similaire aux lipides cationiques, les polymères forment en majorité des complexes avec les acides nucléiques via des liaisons électrostatiques.⁵⁵ Les polymères sont particulièrement intéressants car ils sont faciles à produire.

Les vecteurs de synthèse sont extrêmement nombreux, il existe de nombreux types différents selon les composés utilisés. N'étant pas précisément le sujet de la thèse, nous ne nous attarderons pas dessus.

Les méthodes physiques de transfert

Il existe également des méthodes physiques de transfert de gènes. Les méthodes physiques se basent sur le fait d'utiliser des forces physiques pour agir sur la membrane cellulaire et permettre le passage intracellulaire⁵⁶.

Aiguille : La plus simple méthode physique correspond à l'utilisation d'aiguilles pour transférer l'acide nucléique directement dans le tissu cible ou alors dans les vaisseaux sanguins pour une approche systémique. L'efficacité est limitée du fait de leur dégradation par les nucléases⁵⁷.

Gene Gun : Il s'agit de type pistolet est un appareil permettant d'administrer de l'ADN exogène dans cellules cibles. Il s'agit généralement d'un métal lourd recouvert d'ADN (généralement un ADN plasmidique). Avec cette technique il y a peu de toxicité. Il est cependant difficile d'atteindre des cellules profondes.

Electroporation : L'application d'un champ électrique crée une différence de potentiel en un point spécifique de la surface de la cellule. En conséquence, la rupture de la membrane forme un pore et laisse passer la molécule. La perméabilité dépend de la force et de la durée du champ électrique. La première utilisation de la technique d'électroporation *in vivo* pour un transfert de gène a eu lieu en 1991⁵⁸.

Sonoporation : La sonoporation est une technique non invasive qui utilise une onde ultrasonore pour perméabiliser temporairement la membrane cellulaire afin de permettre l'absorption cellulaire de l'ADN. Il s'agit d'une technique entraînant peu d'effets indésirables mais l'efficacité est limitée.

Photoporation : Cette méthode physique utilise une seule impulsion laser pour générer des pores transitoires sur la membrane cellulaire afin de permettre à l'acide nucléique d'entrer dans la cellule.

Hydroporation : La technique utilise la pression hydrodynamique pour pénétrer dans la membrane cellulaire.

Ces méthodes physiques peuvent être utilisées *in vivo*. Des essais principalement sur des modèles animaux existent et ont été décrits dans la littérature. Cependant ce ne sont pas les méthodes les plus fréquentes ni celles présentant le plus de bénéfices.

Les méthodes inorganiques

Il existe enfin une dernière catégorie de vecteurs, les vecteurs inorganiques.

Ce sont généralement des nanoparticules dont la taille, la forme et la porosité peuvent varier afin de protéger l'acide nucléique piégé de la dégradation. Les principales nanoparticules utilisées sont en phosphate de calcium, en silice ou encore en or. L'avantage principal des composés inorganiques provient de leur facilité à être produit à faible coût. De plus le stockage est facile.

Pour conclure, les deux stratégies, virales et non virales ont connu de fortes améliorations au cours des 10 dernières années. Ces améliorations sont finalement en corrélation avec le

développement de la thérapie génique. En effet, les vecteurs sont essentiels à l'efficacité et la sécurité des thérapies géniques.

Chaque vecteur a des avantages et des inconvénients. Il ne s'agit pas ici de dire lequel est le meilleur. Nous allons voir dans la partie suivante les critères permettant de choisir le vecteur le plus adapté à l'application souhaitée.

3- Le choix du vecteur

Le choix du vecteur est essentiel lors du développement d'un nouveau traitement et particulièrement en thérapie génique *in vivo*.

L'efficacité du traitement est très dépendante de la capacité de l'acide nucléique à atteindre la cellule cible.

Nous avons vu précédemment que du fait de cette nécessité, de nombreuses méthodes ont été développées.

Le choix du vecteur dépend de plusieurs facteurs :

1. Le premier facteur à prendre en compte est le type de thérapie génique que l'on souhaite développer, *in vivo* ou *ex vivo*. Logiquement certains vecteurs seront plus adaptés à une utilisation *in vivo* tandis que d'autres à une utilisation *ex vivo*.

En effet, certains organes seront plus faciles d'accès que d'autres dans une utilisation *in vivo*. Certaines méthodes de transfert seront plus adaptées pour atteindre un certain type cellulaire.

Le challenge le plus important d'une utilisation *in vivo* est d'éviter le « off-target », c'est-à-dire de permettre à l'acide nucléique d'atteindre les cellules d'intérêt et uniquement les cellules d'intérêt. Si l'on souhaite utiliser un vecteur viral, il faudra considérer le tropisme de ce vecteur. Chaque famille de virus a un tropisme différent et dans une même famille, différents sous types de virus ont également des tropismes différents. Par exemple, Carmela Zincarelli et Al.⁵⁹ ont étudié le tropisme des différents sous types d'AAV et ils ont mis en évidence le fait que le profil de distribution de chaque

sous type est différent.

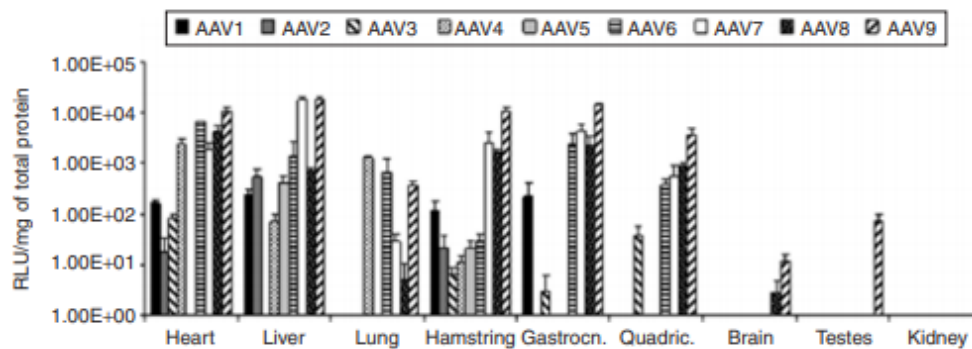


Figure 16 : Tropisme des sous types d'AAV

2. Ensuite il faut évaluer si l'application thérapeutique nécessite une expression du gène transféré transitoire ou stable. Nous avons vu dans la partie précédente que certains vecteurs s'intègrent au génome de l'hôte tandis que d'autres non. C'est cette intégration qui va être responsable de l'effet transitoire ou stable de la thérapie. Selon l'effet thérapeutique que l'on souhaite, le choix du vecteur sera naturellement différent.
3. La taille du gène à transférer doit être prise en compte. Nous avons notamment vu que les vecteurs viraux ont des capacités spécifiques. Le choix du vecteur dépend de ce que l'on souhaite transporter.
4. Naturellement, le type de molécule que l'on souhaite délivrer sera également à prendre en compte. En effet, certaines méthodes de transfection sont plus adaptées à l'ADN qu'à l'ARN par exemple.
5. La cytotoxicité des méthodes de transfert est également à prendre en compte. Certaines technologies peuvent entraîner des toxicités importantes qui pourront poser problème selon l'utilisation étudiée. De plus, il faut préciser qu'une même technologie peut présenter des profils de toxicité différents selon la cellule ciblée.
6. Enfin le coût est également un facteur à prendre en compte. Certaines méthodes telles que les méthodes virales sont cher du fait des coûts de production. Tandis que d'autres méthodes telles que les vecteurs de synthèse ou les vecteurs inorganiques sont moins cher à produire.

Notons qu'il ne s'agit pas ici d'une liste exhaustive. Le choix de vecteur est primordial, le choix se base sur de nombreux critères permettant au final d'obtenir l'objectif thérapeutique

voulu. Il n'y a pas de hiérarchie à faire entre ces différentes techniques, chacune présente des avantages et des inconvénients.

Nous allons voir maintenant les différentes techniques de thérapie génique utilisées dans des applications in vivo.

C- Les technologies de thérapie génique in vivo

La thérapie génique s'appuie sur plusieurs techniques⁶⁰ que nous allons étudier maintenant. Chaque technique est différente et permet de traiter des pathologies particulières. Comme depuis le début de ce travail, nous allons nous concentrer sur les techniques de thérapie génique in-vivo.

1- Transfert d'acides nucléiques in vivo

L'application la plus ancienne et la plus classique de thérapie génique est le transfert d'acide nucléique. A l'aide de vecteurs, l'acide nucléique est administré in vivo. Il code pour une molécule qui aura un impact sur le patient. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une molécule d'ADN qui est transférée. Cependant, des nouveaux traitements à base d'ARN messagers⁶¹ commencent à se développer en phases cliniques et précliniques.

Ces nouveaux traitements sont extrêmement intéressants⁶² car par rapport aux protéines, ils évitent de nombreux problèmes de production tels que la purification qui est difficile et coûte cher. De plus, par rapport à l'ADN, ils ne modifient pas le génome et à ce titre ils présentent moins de risques.

Cependant, le problème des ARNm a longtemps été la délivrance. En effet ce sont des grosses molécules qui ont du mal à passer la membrane cellulaire. De plus, elles sont très rapidement dégradées dans le corps par les nucléases. Mais les avancées dans les systèmes de délivrance permettent maintenant d'être très optimiste dans leurs potentiels thérapeutiques. Comme pour les molécules d'ADN, les molécules d'ARNm peuvent coder pour tous types de protéines et donc avoir des applications différentes.

Ajout d'une protéine fonctionnelle

La première possibilité est que cet acide nucléique code pour une molécule fonctionnelle qui et soit manquante soit défaillante chez le patient.⁶⁵

C'est notamment le cas dans le traitement de maladies monogéniques, qui résultent d'une mutation qui affecte un seul gène. Dans le cas d'une maladie monogénique, un gène spécifique est muté, et c'est cette modification qui peut conduire à la maladie. De ce gène muté, il en résulte soit une absence de protéine, soit une protéine défectueuse. Le transfert de gène permet d'apporter le gène codant pour la molécule d'intérêt.

C'est une des voies de traitement envisagée pour la mucoviscidose. En effet, la mucoviscidose est causée par des mutations génétiques du gène responsable de la production de la protéine régulatrice de la conductance transmembranaire : la protéine CFTR⁶³ (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Les scientifiques explorent la possibilité de transférer chez les patients soit l'ADN soit l'ARN codant pour une version correcte de cette protéine défectueuse.

Il est également possible d'apporter un gène codant pour une protéine qui permettra d'apporter une nouvelle fonction à la cellule. Ceci peut être le cas par exemple pour des maladies infectieuses en apportant une protéine permettant à la cellule de se protéger contre l'agent infectieux. Nous retrouvons aussi cette utilisation dans certains cancers.

La protéine pourra également permettre d'activer le système immunitaire dans une application de vaccinologie.

Utilisation de gène suicide

Dans certaines situations, il peut être nécessaire de tuer des cellules d'un patient. C'est principalement le cas dans des applications en cancérologie. Pour lesquelles la thérapie génique peut être utilisée.

Deux modes d'action sont possibles :

- Le gène introduit peut coder pour une molécule toxique qui conduira à la mort de la cellule⁶⁴.
- Le gène peut également coder pour une protéine qui « marquera » la cellule et la rendra visible au système immunitaire. Le système immunitaire sera alors responsable de la mort de la cellule. Ici, la mort cellulaire n'est pas directement causée par la protéine du gène transféré.

Inhibition d'une protéine fonctionnelle

Le transfert d'acides nucléiques peut également permettre d'inhiber une protéine fonctionnelle qui aurait un effet délétère sur le patient. Cette stratégie peut être également une stratégie d'intérêt dans les cancers en visant des oncogènes.

Il existe également d'autres types de stratégies permettant d'inhiber l'activité d'un gène : l'utilisation d'oligonucléotides.

2- Les oligonucléotides : Gene silencing ou extinction de gènes

Les oligonucléotides sont utilisés en thérapie génique pour éteindre l'expression de certains gènes défectueux. Cette stratégie est appelée « gene silencing ».

Il existe deux types d'oligonucléotides utilisés pour inhiber l'expression de certains gènes :

- Les ARN antisens
- Les ARN interférents

Ces oligonucléotides sont constitués d'une courte chaîne d'acide nucléique. Ils vont cibler les ARNm et les pré-ARNm des gènes d'intérêt pour moduler leur expression en protéines.

Bien qu'ils utilisent une technique similaire, ces deux types d'oligonucléotides ont des mécanismes d'action différents.

La principale différence est que les ARN antisens n'existent pas à l'état naturel alors que les ARN interférents existent chez les végétaux et les animaux. C'est en étudiant ces mécanismes que les scientifiques ont imaginé des applications thérapeutiques.

Les ARN antisens

Les ARN antisens agissent en inhibant la traduction de l'ARN messager contre lequel ils sont dirigés. L'ARN antisens doit être complémentaire de l'ARNm cible et se lie de manière complémentaire à ce dernier.

En effet, les ARN sont constitués de 4 types de bases : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et l'uracile (U).⁶⁶ Ces bases se lient de manière complémentaire entre elles :

- L'Adénine avec l'Uracile
- la Guanine avec la Cytosine

Dans le cas de la molécule d'ADN, la Thymine remplace l'Uracile.

Les oligonucléotides se basent sur ces caractéristiques pour se lier de manière spécifique à un ARNm.

L'ARN est appelé antisens car il reconnaît spécifiquement un ARNm sens. Les bases composant l'ARN antisens se lient de manière complémentaire avec les bases de la molécule d'ARNm cible.

Concrètement, l'association entre l'ARN antisens et l'ARNm sens forme un ARN double brin. Cet ARN double brin est reconnu par une enzyme responsable de sa dégradation, la RNase.

Les thérapies antisens sont donc conçues pour rechercher, lier et détruire un ARNm de manière très spécifique, de sorte que la quantité de protéines causant la maladie diminue considérablement.⁶⁷

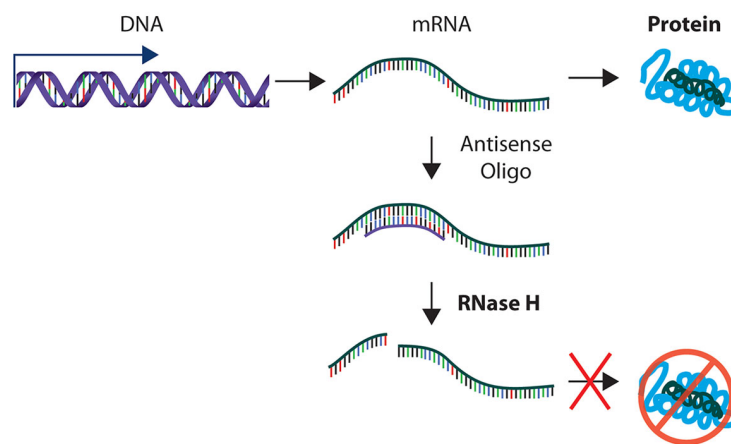


Figure 17 : Mécanisme d'action d'un ARN antisens⁶⁸

Les ARN antisens peuvent également passer la membrane nucléaire et se fixer sur la molécule d'ADN. La molécule d'ADN est double brin. En se fixant dessus, l'ADN va former une triple hélice. Cette conformation va inhiber la transcription en ARNm et donc par suite la traduction en protéine⁶⁹.

La taille de l'ARN antisens est critique car elle doit être suffisamment longue pour avoir une séquence de base unique et donc se fixer de manière spécifique. L'ARN ne doit cependant pas être trop grand pour garder sa capacité à passer les membranes cytoplasmiques et nucléaires.

ARN interfèrent ARNi

Les ARN interférents ou ARNi sont des mécanismes endogènes d'origine naturelle retrouvée chez les plantes et les animaux.⁷⁰ Ils permettent de réguler l'expression de protéines. Les scientifiques ont voulu détourner ces processus pour en faire des médicaments permettant d'inhiber la production de protéines cibles.⁷¹

Comme pour les ARN antisens, il s'agit d'un processus dans lequel des petites molécules ARN inhibent l'expression d'un gène en agissant sur un ARNm cible, de manière à ce qu'il y ait une diminution des protéines produites.

Il existe deux grands types d'ARN interférent :

- Les small interfering RNA (siRNA)
- Les microRNAs (miRNA).

Ces oligonucléotides peuvent viser des gènes responsables de maladies et nous pouvons facilement imaginer l'impact de ces traitements. En effet, ils peuvent potentiellement inhiber l'expression de tous types de gènes.

Les small interfering RNA (siRNA)

A l'état naturel, les siRNA sont des petites molécules d'ARN double brins provenant d'un ARN double brin plus grand.

Lorsque ce long ARN double brin est présent dans le cytoplasme des cellules, il est pris en charge par une enzyme nommée DICER.

DICER est une RNase de type III. Elle va couper la longue molécule en petit ARN double brin. Une fois formés, les siRNA s'associent à un complexe protéique qui sera responsable de l'activité, le RNA-Induced Silencing Complex (RISC). Le complexe RISC activé s'apparie à l'ARNm par l'intermédiaire des siRNA, qui ont une correspondance de séquence parfaite avec leur cible. Cela déclenche alors la dégradation de l'ARNm. L'utilisation thérapeutique est intéressante car, les siRNA peuvent inhiber la production des protéines que l'on souhaite. Nous verrons plus tard qu'il y a déjà des médicaments utilisant ces siRNA.

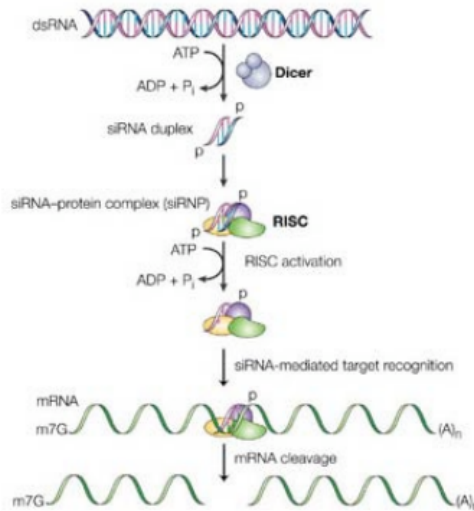


Figure 18 : Mécanisme d'action des SiRNA⁷²

Les microRNAs (miRNA)

La synthèse du micro-ARN débute dans le noyau. Ils sont endogènes donc codés par le génome de la cellule. Le résultat de la transcription est clivé dans le noyau par la RNase Drosha, pour former le pré micro ARN. Ensuite, ils sont clivés dans le cytoplasme, par l'enzyme DICER, en plusieurs oligonucléotides double brin.

Puis, l'ARN double brin se sépare en micro ARN simple brin. Enfin, le micro-ARN mature est incorporé au complexe RISC. Au sein du complexe RISC, le micro-ARN va pouvoir se fixer, avec une complémentarité totale ou partielle, à son ARN messager cible pour induire sa dégradation, sa séquestration ou l'inhibition de sa traduction.

Les micro ARN sont également utilisés en thérapeutiques pour inhiber la traduction de la protéine souhaitée.

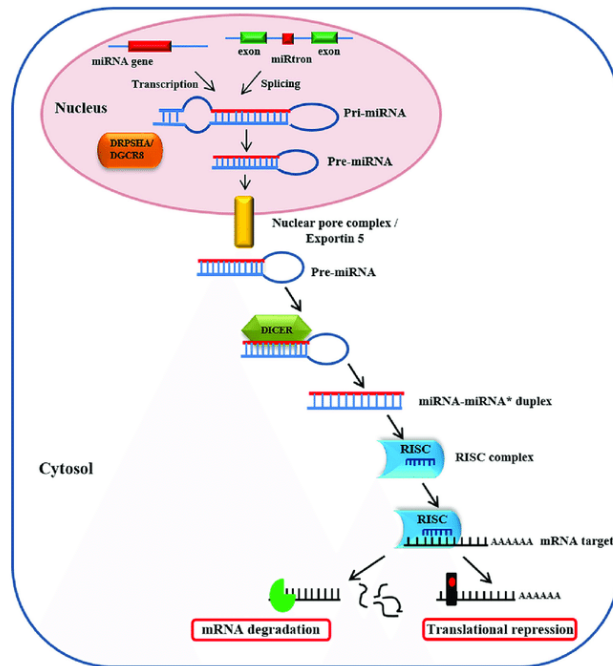


Figure 19 : Mécanisme d'action des miRNA⁷³

3- Les techniques d'édition du génome ou « gene editing »

Des nouvelles techniques sont apparues récemment sous le nom de « gene editing » ou édition du génome. Comme son nom l'indique, les techniques de gene editing permettent de modifier les séquences d'ADN. Ces techniques sont intéressantes car elles permettent d'apporter des modifications génétiques précises et spécifiques au génome. Avec ces techniques, il est possible de désactiver un gène, d'introduire une mutation ciblée, de corriger une mutation spécifique ou d'insérer un nouveau gène.⁷⁴

Elles ouvrent la voie à des nouvelles thérapies d'importance majeure pour les patients.

Ces technologies ont considérablement amélioré notre capacité à apporter des modifications précises au génome des cellules eucaryotes. Nous allons étudier les techniques principales d'édition du génome et notamment la techniques CRISPR / CAS9 source de grands espoirs thérapeutiques.

Les TALEN

Les TALEN sont des enzymes de restrictions capables de couper un brin d'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Les TALEN sont des protéines chimériques, constituées d'un

domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine endonucléasique. Elles vont induire une cassure double-brin d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de la cassure peut alors s'accompagner de mutations. De cette façon, les TALEN peuvent être utilisées pour cibler des mutations au niveau de sites choisis du génome.⁷⁵

Les TALEN combinent les propriétés de liaison à l'ADN des TALE (transcription activator-like effector) et de clivage de l'ADN par l'endonucléase FokI (Flavobacterium okeanoikoites endonuclease I).

La région centrale des TALE est composée d'un nombre variable de répétitions. Chaque répétition est constituée de 34 acides aminés et se lie à un nucléotide cible unique.

Les TALE s'associent alors à l'ADN en formant une hélice qui s'enroule autour de l'ADN où chaque répétition reconnaît un nucléotide de la séquence cible.

Depuis leur découverte, les TALEN ont été utilisées *in vivo* dans de nombreux organismes différents et elles ont prouvé leurs potentiels thérapeutiques.

Les Méganucléases

Les méganucléases sont des enzymes de restriction, c'est-à-dire des protéines capables de couper un fragment d'ADN. Grâce à ces enzymes, il serait donc possible d'opérer une recombinaison du génome.⁷⁷ Les Méganucléases ont été utilisés dans des types variés de cellules et d'organismes, y compris les cellules de mammifères et les plantes.⁷⁶

Les méganucléases peuvent être divisées en 5 familles selon leurs séquences et leurs structures. La famille LAGLIDADG est la plus étudiée.

Elles ont la capacité de couper une séquence de nucléotides précise et donc un gène potentiellement défectueux.

Les Méganucléases ont un site de reconnaissance de grande taille. Cela leur confère une spécificité de reconnaissance importante. Cette spécificité permet donc de viser précisément le gène à réparer et d'éviter d'avoir un effet sur le reste du génome.

De plus, cette précision permet d'assurer une toxicité cellulaire bien moindre qu'en utilisant d'autres enzymes de restriction moins précises.

Les nucléases à doigts de zinc (ZFN)

Les nucléases à doigts de zinc ou ZFN sont des enzymes de restriction artificielle créées par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN, de type « doigt de zinc », et d'un domaine catalytique de coupure de l'ADN (le plus souvent la nucléase FokI).⁷⁸

Le motif en doigt de zinc est un domaine protéique de 30-50 acides aminés repliés autour d'atomes de zinc ionisés conférant une charge positive au motif. Il est donc chélateur de l'ADN chargé négativement.

En effet, les domaines de liaison à l'ADN des ZFN contiennent généralement entre 3 et 6 répétitions individuelles à doigts de zinc et peuvent chacun reconnaître entre 9 et 18 paires de bases. Cela confère à cette technique une très grande spécificité de liaison.

Après la liaison entre les domaines protéiques et l'ADN, l'enzyme FokI clivera l'ADN.

Les ZFN ont été conçues, construites et utilisées avec succès pour des gènes individuels dans une grande variété d'organismes et de types de cellules.

L'utilisation in vivo de ces techniques peut être réalisée de deux façons. La première est l'administration de ces composés protéiques dans l'organisme. La seconde façon est l'administration d'acides nucléiques codant pour la technique de « gene editing » souhaitée en utilisant différents vecteurs viraux ou non.

Nous allons maintenant étudier la technique la plus récente mais aussi certainement la plus prometteuse, la technique CRISPR-Cas9.

La technique CRISPR / CAS9

Le dernier système d'édition du génome que nous allons voir est un système très récent qui a révolutionné l'édition génomique. Il s'agit du système CRISPR-Cas9.

CRISPR-Cas9 est un outil moléculaire qui permet d'effectuer des corrections géniques précises⁸⁰. Cette découverte, a permis à la Française Emmanuelle Charpentier et l'Américaine Jennifer Doudna d'obtenir en récompense de leurs travaux le prix Nobel 2020 de chimie¹⁴⁰.

La première différence importante avec les systèmes vus précédemment est que CRISPR reconnaît la séquence d'ADN cible à l'aide d'un ARN guide. L'ARN guide reconnaît spécifiquement l'ADN en formant des liaisons Watson-Crick vues précédemment (Adénine avec Guanine et Thymine avec Cytosine). Ensuite, c'est la nucléase Cas9 qui coupera l'ADN en un endroit précis.

Cette capacité de couper l'ADN de manière très précise permet à ce système une utilisation très large.

CRISPR-Cas9 fonctionne comme des ciseaux génétiques : il cible une zone spécifique de l'ADN, la coupe et y insère la séquence souhaitée.

L'avantage principal du système CRISPR-Cas9 tient dans sa production facilitée. En effet, il est beaucoup plus facile, rapide et moins coûteux de produire des ARN guides que des protéines.

CRISPR-Cas9 peut être utilisé pour inhiber l'expression d'un gène, pour couper une partie d'un gène et aussi pour remplacer une partie d'un gène défectueux.

CRISPR therapeutics, la société créée par les inventeurs du système CRISPR-Cas9 commence à mettre en place des programmes de développement in vivo en s'appuyant sur les preuves de concept réalisés ex vivo. Actuellement deux approches sont en cours de test :

- La première utilise un vecteur AAV codant pour le système d'édition du génome
- Le second utilise un vecteur à nanoparticules lipidiques qui transporte un ARNm codant le système CRISPR-Cas9.

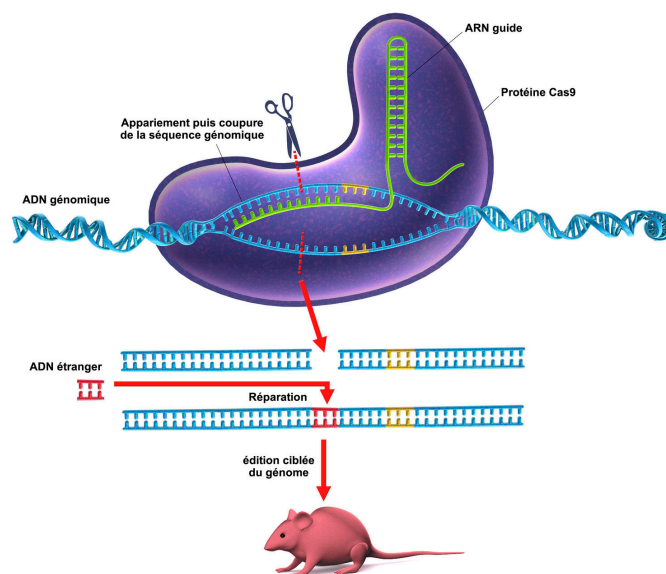


Figure 20: Mécanisme d'action de CRISPR/Cas9⁸¹

	CRISPR-Cas9	TALEN	ZFN	Méganucléase
Reconnaissance (tête chercheuse/cible)	ARN-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN
Cibles non désirées (<i>Off targets</i>)	Peu étudié > TALEN ?	< CRISPR < ZF	> aux TALEN	Potentielles
Cibles multiples (<i>Multiplexing</i>)	Facile	Difficile Rarement utilisé	Difficile Rarement utilisé	Difficile Rarement utilisé
Séquences cibles	Adjacentes à PAM Dépendent des espèces	Chaque répétition TAL lie une paire de bases. Nécessite une thymine pour une activité maximale	Chaque ZN lie une séquence de 3 paires de bases. Toutes ne peuvent pas être ciblées	Site de reconnaissance préexistant qui ne doit pas être contenu dans le vecteur de ciblage

Figure 21 : Comparaison des techniques d'édition du génome⁸²

4- Virus Oncolytique

Les virus oncolytiques sont une nouvelle voie de thérapie génique utilisée principalement en oncologie⁸⁴.

En effet, les virus oncolytiques, par définition, sont des virus capables d'infecter et de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses, menant à la mort cellulaire sans nuire aux cellules saines.

Nous avons vu précédemment que les virus sont beaucoup utilisés en thérapie génique, notamment pour transférer des gènes thérapeutiques.⁸³ Les virus oncolytiques ont la capacité, soit de manière innée soit plus fréquemment par modifications génétiques de se répliquer sélectivement dans les cellules cancéreuses et induire leur mort par différents mécanismes tels que la lyse cellulaire, l'induction de l'apoptose et de l'autophagie, l'expression de protéines toxiques et l'arrêt de la synthèse des protéines.

Certains virus oncolytiques peuvent aussi avoir la fonctionnalité d'activer la réponse immunitaire anti-tumorale. L'activation du système immunitaire est très importante en oncologie puisque certaines cellules tumorales ont parfois la capacité d'échapper au système immunitaire.

Plusieurs types de virus peuvent être utilisés dans cette application (Adenovirus ; Herpès simplex virus ; Vaccinia virus etc.)

Nous verrons dans la partie suivante que certains virus oncolytiques sont déjà commercialisés.

Les virus oncolytiques doivent pouvoir infecter de façon sélective et spécifique les cellules tumorales de l'organisme.

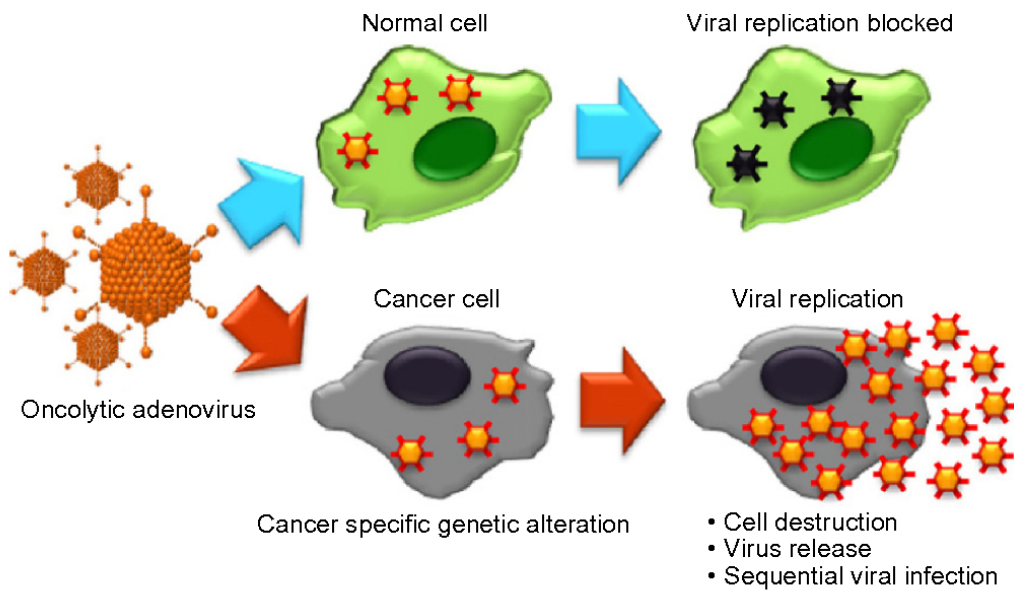


Figure 22: Mécanisme d'action des virus oncolytiques⁸⁵

5- La technique des CAR T cell in vivo

La dernière technologie d'intérêt présentée ici est la technique des CAR T cell. Il s'agit d'une technologie très récente mais qui pourrait avoir un impact important dans le monde de la santé. A l'origine, l'utilisation des CART cell se fait de manière ex vivo.

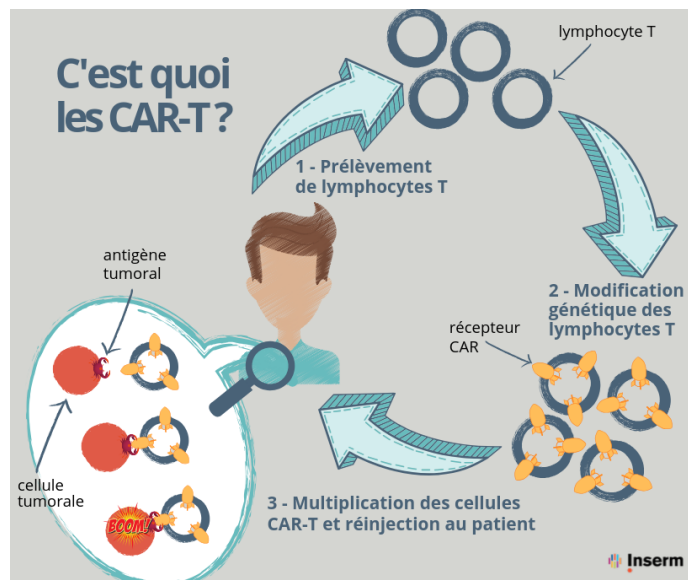


Figure 23 : Les CAR T cell ex vivo⁸⁶

L'idée est relativement simple, elle consiste à prélever les lymphocytes T des patients pour les modifier génétiquement afin de les rendre efficaces dans l'élimination des cellules cancéreuses, pour ensuite les réinjecter aux patients.

La modification génétique consiste à faire exprimer à ces cellules, un récepteur antigénique chimérique, ou « *Chimeric Antigen Receptor* » (*CAR*) en anglais. Ce CAR, permet de reconnaître de manière spécifique un antigène exprimé par les cellules cancéreuses. Il joue le rôle d'une tête chercheuse contre les cellules cancéreuses.

Dans le même principe, il se développe également des CAR NK cell⁸⁷. Dans ce cas-là, ce ne sont plus des lymphocytes T mais des cellules Natural Killer (autre acteur important de l'immunité) qui sont modifiées génétiquement.

Actuellement, il y a deux CAR T cell ex vivo commercialisées : Le Kymriah de Novartis et le Yescarta de Gilead.

Mais si nous parlons de cette technologie dans cette thèse, c'est que des travaux in vivo sont en cours.⁸⁸ En effet, plusieurs articles scientifiques font état de transfert de gène in vivo codant pour la machinerie CAR. Les modifications génétiques des cellules se feraient alors in vivo. Par exemple, des travaux font état de lentivirus transportant le matériel génétique nécessaire et visant les lymphocytes T.

Actuellement, ces premiers essais in vivo sont à des phases très précoces de développement d'un médicament. Des preuves de concept vont devoir être réalisées pour confirmer le potentiel thérapeutique des CAR T cell in vivo.

Ainsi, il existe les différentes techniques de thérapies géniques pouvant être utiliser in vivo. Certaines sont à un stade plus avancé que d'autres. Il est important de noter que l'utilisation in vivo présente des difficultés cliniques propres.

D- Les difficultés cliniques et thérapeutiques de la thérapie génique in vivo

Il existe des difficultés cliniques à l'utilisation in vivo de ces technologies. Ces difficultés ralentissent le développement des nouveaux médicaments. Pour se développer à grande échelle, la thérapie génique in vivo devra dépasser ces limites.

1. La délivrance

Nous l'avons vu, la première limite au développement de la thérapie génique in vivo est la méthode de délivrance⁸⁹. Le choix du vecteur permet premièrement de protéger l'acide nucléique lors de sa délivrance aux cellules cibles. Il devra permettre d'éviter la dégradation de l'acide nucléique dans l'organisme (par exemple par les nucléases). De plus, les vecteurs permettent de cibler spécifiquement les cellules d'intérêt et d'éviter le « off target ». Le vecteur doit atteindre les cellules d'intérêt, celles qui ont besoin de la protéine codée par l'acide nucléique. Les autres cellules ne doivent pas être touchées.

Le système de délivrance devra aussi permettre à l'acide nucléique de passer la membrane cytoplasmique et la membrane nucléaire dans le cas de l'ADN.

Le système de délivrance joue un rôle primordial dans l'efficacité et la sécurité du produit. Malgré de réels progrès, la délivrance est encore un point d'attention particulier lors du développement en thérapie génique.

2. L'intégration au génome

L'intégration au génome peut être une limite importante de sécurité. Dans certains cas, si l'on souhaite un effet à long terme, l'intégration au génome peut être recherchée. L'insertion dans le génome donne l'expression la plus durable parce que le gène est conservé après la division cellulaire. Cependant, il est essentiel de contrôler le lieu d'insertion, car une insertion au mauvais endroit peut entraîner une absence d'expression du gène inséré.

De plus, l'intégration au génome doit être spécifique à un site précis. Si elle n'est pas spécifique, elle posera un problème de sécurité et fera courir un risque important aux patients notamment en pouvant avoir un effet oncogène.

Si le but recherché est une action transitoire, il ne doit pas avoir d'intégration au génome. En cas d'intégration, le risque est important pour le patient.

L'intégration au génome est un paramètre important à prendre en compte notamment lors du choix du vecteur.

3. L'immunogénicité

Une des difficultés importantes pour les laboratoires de thérapie génique est l'activation du système immunitaire ou l'immunogénicité.

En effet, la thérapie génique *in vivo* repose sur l'administration de matériel étranger. Le matériel étranger est reconnu par le système immunitaire qui s'active pour combattre ce dernier⁹⁰. Lorsqu'un matériel étranger pénètre dans l'organisme, la réponse immunitaire innée se met en place avec notamment la production de cytokines et l'activation de cellules immunitaires (macrophages ; Natural killer etc.). La réponse immunitaire adaptative s'active plus tard lorsque les cellules présentatrices d'antigènes activent les lymphocytes.

Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle sur l'immunogénicité. Nous citerons par exemple, la dose de vecteurs, la voie d'administration ou encore les antécédents du patient.

Pour atténuer cette immunogénicité, le choix du vecteur est important. L'immunogénicité est généralement d'autant plus importante avec l'utilisation de vecteurs viraux qui contiennent des épitopes étrangers qui seront reconnus par le système immunitaire.

Les développeurs de médicaments cherchent à atténuer la réaction immunitaire qui pourrait entraîner des effets indésirables aux patients et réduire l'efficacité du traitement.

Nous précisons cependant, que dans certains cas l'activation du système immunitaire peut être recherchée. C'est notamment le cas pour le traitement de certains cancers qui échappent à l'activation du système immunitaire ou dans le cas de maladies infectieuses.

IV- État des lieux des produits et du marché de la Thérapie Génique in vivo

Nous avons vu précédemment le cadre réglementaire qui régit la thérapie génique ainsi que les techniques utilisées par les laboratoires. Nous allons étudier maintenant le marché actuel de la thérapie génique. Nous évaluerons la maturité de ce marché en étudiant les produits commercialisés et les produits en développement.

Enfin, nous étudierons les limites actuelles au développement de ces technologies.

Nous allons dans un premier temps nous concentrer sur les produits de thérapie génique commercialisés. La thérapie génique est récente, il y a à l'heure actuel peu de produits sur le marché.

A- Les produits commercialisés

Pour débiter cet état des lieux du marché de la thérapie génique, nous allons étudier les produits actuellement sur le marché. Il s'agit de tous les produits bénéficiant d'au moins une AMM dans un pays du monde.

Dans cet état des lieux des produits, nous allons nous intéresser premièrement aux oligonucléotides commercialisés. En effet, nous allons voir dans un premier temps les technologies d'ARN antisens et interférents commercialisées.

Dans un second temps, nous étudierons les produits de thérapie génique correspondant au transfert d'acide nucléique.

A noter, qu'il n'y a à l'heure actuelle aucun produit utilisant des technologies de « gene editing » sur le marché.

1- Les oligonucléotides commercialisés

Les ARN interférents

Aujourd'hui, deux ARN interférents sont commercialisés. Les deux produits sont commercialisés par la société Alnylam Pharmaceutical⁹⁴ :

Il s'agit de l'**Onpattro® (Patisiran)**¹³². Il est indiqué dans le traitement d'une maladie métabolique, l'amylose à transthyrétine héréditaire (hATTR) chez les adultes atteints de polyneuropathie de stade 1 ou de stade 2. Elle est due à l'accumulation d'une protéine la transthyrétine ou TTR, qui sert habituellement à transporter des substances dans le sang. Lorsque le gène est muté, la protéine fabriquée est modifiée. Cette protéine anormale se dépose sous forme de substance « amyloïde » dans les tissus. L'accumulation dans les nerfs et les organes de la protéine mutée entraîne une perte de sensibilité et de mobilité, des douleurs, des troubles digestifs, sexuels ou encore cardiaques.

Le traitement se base sur le mécanisme d'action des ARNi présenté plus tôt dans le rapport. Il inactive le gène muté défaillant responsable de la pathologie et diminue donc le taux de protéines responsables de la maladie.

L'Onpattro® est commercialisé en Europe et aux Etats-Unis. Il a obtenu la désignation de médicament orphelin par l'EMA.

Givlaari® (Givosiran)¹³³ est commercialisé dans la Porphyrie hépatique aigue et ayant une maladie active. Les porphyries aiguës résultent d'un déficit de certaines enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème, qui entraîne l'accumulation de précurseurs de l'hème qui déclenchent des accès intermittents de douleurs abdominales et de symptômes neurologiques.

Le médicament entraîne la dégradation de l'ARNm de l'aminolévulinate synthase 1 (ALAS1) réduisant les niveaux élevés d'ARNm de l'ALAS1 hépatique (responsable de la maladie).

Cela conduit à une réduction des taux circulants d'intermédiaires neurotoxiques, l'acide aminolévulinique et le porphobilinogène, facteurs associés aux attaques et autres manifestations de la maladie.

Le Givlaari® a été autorisé très récemment aux Etats-Unis, le 20 Novembre 2019.

Les ARN antisens

Il y a à l'heure actuelle 5 ARN antisens mis sur le marché :

Eteplirsén : Commercialisé par Sarepta therapeutics sous le nom commercial Exondys 51®, il est indiqué dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. L'Eteplirsén vise le saut de l'exon 51 du gène DMD codant pour la dystrophine. Cette maladie est liée à une anomalie du gène DMD codant pour la dystrophine, protéine impliquée dans le soutien de la fibre musculaire. Les fibres musculaires finissent par se détruire.

Le saut d'exon est une technique de "chirurgie du gène" qui a pour objectif de rétablir un "bon" cadre de lecture en éliminant un ou plusieurs exons porteurs de l'anomalie (ici l'exon 51). De ce fait cet exon ne sera pas traduit en protéine. La protéine produite est plus courte, mais fonctionnelle. L'oligonucléotide sert à masquer l'exon que l'on souhaite supprimer. L'Eteplirsén dispose d'une AMM aux Etats unis depuis 2016. En Europe, l'EMA a refusé l'AMM pour ce médicament en 2018 car les essais cliniques concernaient trop de peu de patients (seulement 12).⁹⁵

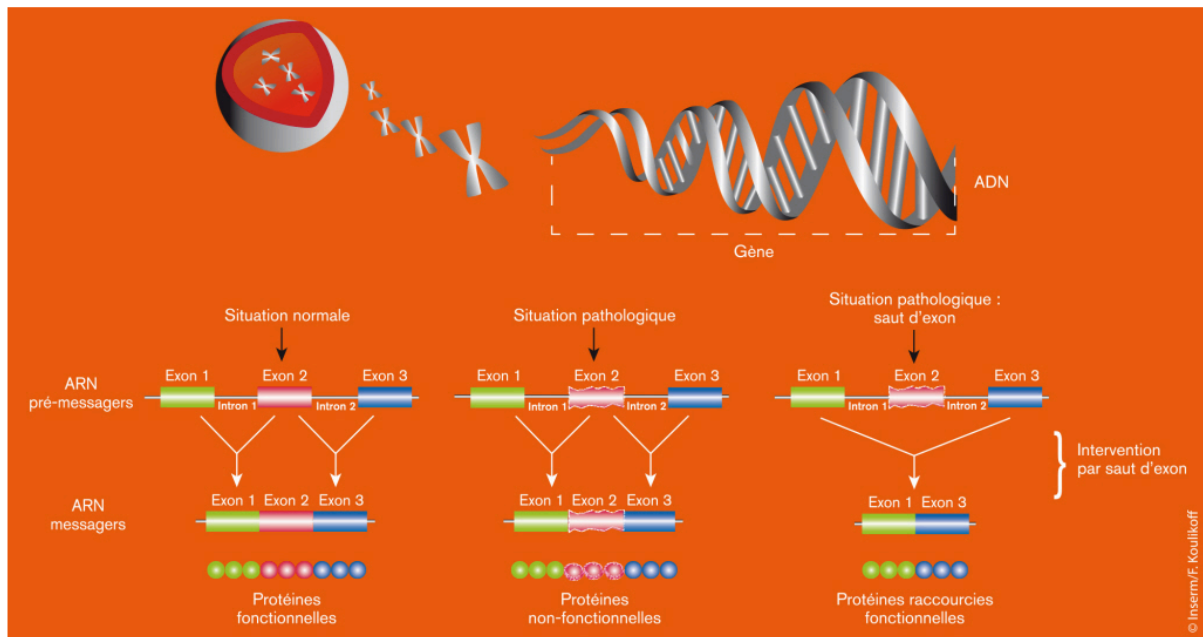


Figure 24 : La technique du saut d'exon⁹⁶

Nusinersén : Commercialisé par le laboratoire Biogen sous le nom commercial Spinraza®. Il est indiqué dans le traitement d'une maladie génétique rare du système nerveux central, l'amyotrophie spinale proximale liée à *SMN1* (SMA), une maladie génétique rare. Cette maladie résulte d'une mutation du gène *SMN1*.

Un autre gène SMN2 est capable de produire la protéine SMN mais elle est non fonctionnelle à cause d'une erreur d'épissage.

L'oligonucléotide va permettre l'augmentation de la production de la protéine SMN en agissant sur l'épissage du gène SMN2.

Lors de son évaluation pas l'EMA, le Nusinersen a obtenu une évaluation accélérée signe de l'importance du produit pour la santé publique. Il a également obtenu la désignation médicament orphelin.⁹⁷

Inotersen: Commercialisé par Ionis pharmaceutical et par Akcea therapeutics sous le nom commercial de **Tegsedi®**. Ionis pharmaceuticals et Akcea therapeutics ont signé un partenariat pour la commercialisation du produit.

Comme pour l'**Onpattro® (Patisiran)**, Inotersen est indiqué dans le traitement de l'amylose à transthyrétine héréditaire (hATTR) chez les patients adultes atteints de polyneuropathie de stade 1 ou de stade 2.

Inotersen provoque la dégradation de l'ARNm du TTR mutant en se liant à l'ARNm TTR, ce qui entraîne une réduction des dépôts de protéines TTR.

L'inotersen a également bénéficié d'une évaluation accélérée et de la désignation médicament orphelin.⁹⁸

Volanesorsen: Commercialisé par Akcea Therapeutics sous le nom commercial Waylivra® , il est indiqué en complément d'un régime diététique chez les patients adultes atteints d'un syndrome d'hyperchylomicronémie familiale génétiquement confirmé et à risque élevé de pancréatite. Volanesorsen est conçu pour réduire la production d'Apolipoprotéine C III (ApoC-III), une protéine produite dans le foie qui joue un rôle central dans la régulation des triglycérides plasmatiques et peut également affecter d'autres paramètres métaboliques. Il agit en ciblant l'ARN messager de l'Apolipoprotéine C III. Il a également obtenu la désignation de médicament orphelin.⁹⁹

Mipomersen: Commercialisé par Kastle therapeutics sous le nom commercial de Kynamro®. Il est indiqué dans le traitement des hypercholestérolémies familiales homozygotes, une pathologie rare mais à l'origine d'infarctus du myocarde avant 30 ans.

Il agit comme inhibiteur de la synthèse d'apolipoprotéine B. Le Mipomersen vise l'ARNm de l'apolipoprotéine B.

Le Mipomersen a obtenu une AMM aux Etats Unis par la FDA en 2013 alors que fin 2012 l'EMA rendait un avis défavorable du fait d'une toxicité hépatique et cardiovasculaire importante.¹⁰⁰

Il n'est actuellement plus commercialisé.

Nous venons de voir les oligonucléotides utilisés en thérapie génique commercialisés. Nous allons voir les médicaments de thérapie génique permettant le transfert de gènes.

L'étude des produits de thérapie génique a permis de mettre en évidence six produits de transfert de gènes utilisant une approche in vivo commercialisés actuellement dans le monde. Nous allons les étudier plus en détail dans la partie qui suit.

2- Étude des produits de thérapie génique par transfert de gène in vivo commercialisés

Neovasculgen®¹³⁴

Le Neovasculgen® (Cambiogenplasmid) est un produit de thérapie génique in vivo commercialisé à l'heure actuelle uniquement en Russie. Des actions sont actuellement menées auprès de la FDA pour obtenir l'AMM aux Etats unis.¹⁰¹

Il est indiqué dans le traitement de la Peripheral Arterial Disease : La maladie artérielle périphérique est un problème circulatoire courant dans lequel le rétrécissement des artères réduit le flux sanguin vers les membres.

Il s'agit d'un plasmide nu codant pour le VEGF. Neovasculgen contient donc le gène du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) inclus dans un vecteur plasmidique. Le transfert du gène codant pour VEGF permet de stimuler la croissance des vaisseaux sanguins et de lutter contre la maladie.

Il est commercialisé par l'Institut des cellules souches humaines PJSC (HSCI) qui est une société publique russe spécialisée dans les biotechnologies et fondée en 2003.

Imlygic®¹³⁵

Imlygic ou Talimogene laherparepvec est un virus de l'herpès simplex de type 1 oncolytique. Il est indiqué en oncologie dans le traitement du mélanome.

Le virus oncolytique infecte et se réplique sélectivement dans les cellules tumorales, induisant ainsi une lyse des cellules tumorales.

Le virus a été génétiquement modifié pour permettre au virus d'être sélectif des cellules cancéreuses et l'empêcher de se multiplier dans les cellules saines.

De plus, le gène ajouté code pour un facteur immunostimulant (GM-CSF) permettant d'activer une réponse immunitaire. Cette activation du système immunitaire est favorable aux traitements contre le cancer.

Imlygic est approuvé par l'EMA et par la FDA. Imlygic a été développé par le laboratoire BioVex. Il est commercialisé par le laboratoire Amgen après le rachat de BioVex pour 1 milliard de dollars.

Gendicine®¹³⁶

La Gendicine est un vecteur adénoviral portant le gène suppresseur de tumeur p53.

Dans de nombreuses pathologies cancéreuses, on observe des délétions ou des mutations de la protéine p53. La Gendicine pénètre dans les cellules tumorales et surexprime la protéine p53 qui stimule l'apoptose des cellules cancéreuses.

La Gendicine est indiquée dans le traitement du cancer de la tête et du cou, du carcinome épidermoïde et du cancer du nasopharynx.

La Gendicine est le premier produit de thérapie génique approuvé pour un usage clinique chez l'homme. Elle a été approuvée en 2003 par la Chinese State Food and Drug Administration.

La Gendicine est fabriquée par Shenzhen SiBiono GeneTech et n'est commercialisée qu'en Chine.

Luxturna®

Voretigene neparvovec ou **Luxturna®** est une thérapie génique basée sur un vecteur viral AAV.

Luxturna® est indiqué dans le traitement des adultes et des enfants présentant une perte visuelle due à une dystrophie rétinienne héréditaire résultant de mutations bi-alléliques confirmées du

gène RPE65 et possédant suffisamment de cellules rétiniennes viables¹³⁷. Il agit comme un activateur de l'épithélium pigmentaire rétinien 65 (RPE65). La protéine RPE65, localisée dans l'épithélium pigmentaire rétinien, est un élément clé du cycle visuel. La protéine RPE65 convertit le rétinol-trans en 11-cis-rétinol, permettant la régénération du pigment visuel.

En effet, la mutation du gène de l'épithélium pigmentaire 65 rétinien entraîne la perte de cellules rétiniennes au fil du temps, ce qui conduit à la cécité totale. Ainsi, le produit améliore la fonction visuelle et rétinienne en introduisant le gène du RPE65 humain.

Oncorine®¹³⁸

L'Oncorine® est un adénovirus oncolytique devant être utilisé en association avec une chimiothérapie comme traitement pour les patients atteints d'un cancer du rhinopharynx au stade avancé.

Les modifications génétiques de l'adénovirus font qu'il se réplique sélectivement dans les cellules cancéreuses sans pouvoir se répliquer dans des cellules saines. Cela induit une cytotoxicité sélective des adénovirus pour les cellules cancéreuses, ce qui conduit à la lyse des cellules cancéreuses.

L'Oncorine® est commercialisé uniquement en Chine par Shanghai Sunway Biotech.

Glybera®¹³⁹

Le Glybera® est un cas particulier car il n'est plus sur le marché. En effet, la société UniQure, qui commercialisait le produit a annoncé qu'elle ne poursuivra pas le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché de Glybera® (alipogène tiparvovec) en Europe, qui a expiré le 25 octobre 2017. Cette décision est basée sur la balance bénéfice-risque peu favorable.

Glybera® était indiqué dans le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase (LPLD). Le Glybera® était un AAV transportant le gène de l'enzyme lipoprotéine lipase LPL, nécessaire pour éliminer les grosses particules graisseuses. Lorsque de telles particules s'accumulent dans le sang, elles peuvent obstruer les petits vaisseaux sanguins.

Zolgensma®

Enfin, Le Zolgensma® est le dernier médicament de thérapie génique commercialisé. Il a été approuvé le 24 mai 2019 aux États-Unis par la FDA.

Zolgensma® (Onasemnogene abeparvovec) est une thérapie génique basée sur un vecteur viral adeno-associé (AAV) transportant le gène SMN1.

Zolgensma® est indiqué dans le traitement de l'amyotrophie musculaire spinale (SMA) chez les enfants de moins de 2 ans atteints de mutations bi-alléliques du gène SMN1 entraînant une expression insuffisante de la protéine SMN. Il s'agit d'une maladie rare, d'origine génétique, qui touche les cellules nerveuses qui commandent les muscles, appelées les motoneurones.

Le produit agit comme activateur de la protéine du SMN.

Le produit a été développé par la société AveXis qui a été rachetée par Novartis pour 8,7 milliards de dollars et qui est donc actuellement une filiale du géant suisse.

Nous noterons également que la Biotech Française Gensight Biologics a déposé en septembre 2020 une demande d'AMM auprès de l'EMA pour son produit Lumevoq®. L'EMA devrait rendre un avis dans les mois à venir. Le produit est indiqué dans le traitement de patients atteints d'une perte d'acuité visuelle due à une neuropathie optique héréditaire de Leber (NOHL) provoquée par une mutation du gène mitochondrial ND4. Le produit est un vecteur de type AAV codant la protéine ND4 humaine sauvage.¹⁴¹

3- Analyse des produits commercialisés

Cette étude des produits commercialisés permet de mettre en évidence quelques utilisations thérapeutiques des techniques étudiées précédemment.

En nous attardant quelques instants sur les indications de ces traitements, nous remarquons rapidement qu'à l'heure actuelle, la thérapie génique traite principalement des maladies rares. Cependant, nous verrons plus tard que la thérapie génique est utilisée dans les produits en cours de développement dans des indications plus fréquentes tels que les cancers. Ce changement d'échelle des produits de thérapie génique pose des problèmes de production que nous traiterons plus tard dans ce rapport.

Cette étude permet également de confirmer le challenge correspondant à l'uniformité réglementaire évoquée précédemment.

En effet, certains produits ont été approuvés par une agence réglementaire et refusés par une autre. C'est par exemple le cas du Mipomersen, autorisé aux Etats unis par la FDA et refusé en Europe par l'EMA.

Certains produits ne sont commercialisés que dans certains pays, le Neovasculgen® en Russie ou la Gencidine® en Chine.

Ce manque d'uniformité internationale pose problème aux laboratoires développant les produits, dans la réalisation de leur demande d'AMM. Les critères étant différents, le travail à réaliser pour obtenir l'AMM est démultiplié. Mais cela nuit aussi à l'accès aux soins des patients à travers le monde.

Enfin, en observant les dates d'obtention des AMM, nous pouvons avoir une idée des maturités des technologies de thérapie génique.

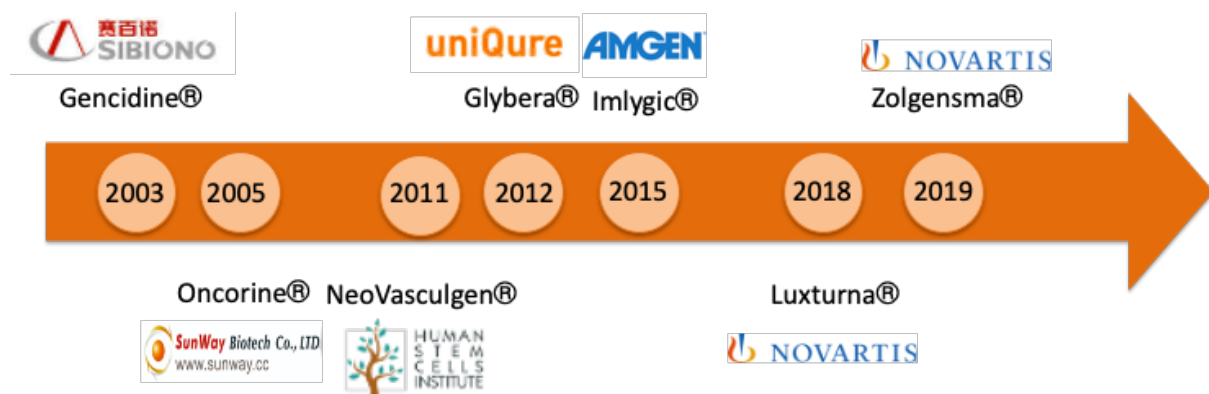


Figure 25 : Obtention AMM de médicaments de thérapie génique par transfert de gène au cours du temps



Figure 26 : Obtention AMM des oligonucléotides au cours du temps

Cette représentation des dates des AMM au cours du temps met en évidence la maturité de chaque technologie. En effet, les médicaments de thérapie génique utilisant des vecteurs viraux pour transférer des gènes semblent plus matures. Les premières AMM sont plus anciennes. Si l'on considère les ARNi et antisens, les AMM sont regroupées sur les cinq dernières années. Enfin, les techniques d'édition du génome sont les moins matures, aucun traitement n'est actuellement sur le marché.

A l'heure actuelle, peu de produits sont commercialisés et ceux qui le sont, le sont depuis peu. Ceci explique que le marché de la thérapie génique est aujourd'hui relativement faible. Cependant nous observons une réelle accélération du nombre de produits commercialisés depuis 5 ans. Cette accélération devrait se poursuivre.

Selon une étude du cabinet Deloitte, le marché de la thérapie génique in vivo devrait croître. Les ventes cumulées devraient atteindre 4 milliards de dollars en 2024.

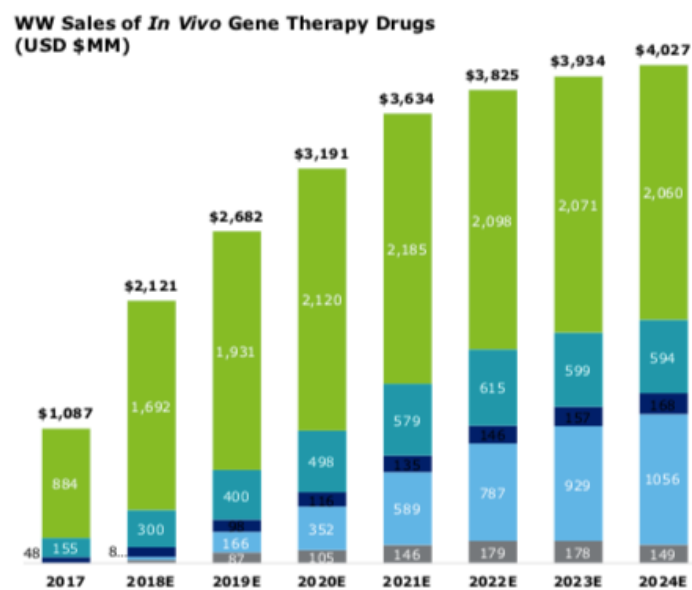


Figure 27 : Évolution des ventes des produits de thérapie génique in vivo¹⁰²

Nous avons étudié en détail les produits de thérapie génique actuellement sur le marché. Du fait de leur faible nombre, il est difficile d'en tirer des conclusions très robustes.

Pour avoir une idée plus précise du marché de la thérapie génique, nous allons étudier les produits en développement.

B- Les produits en développement

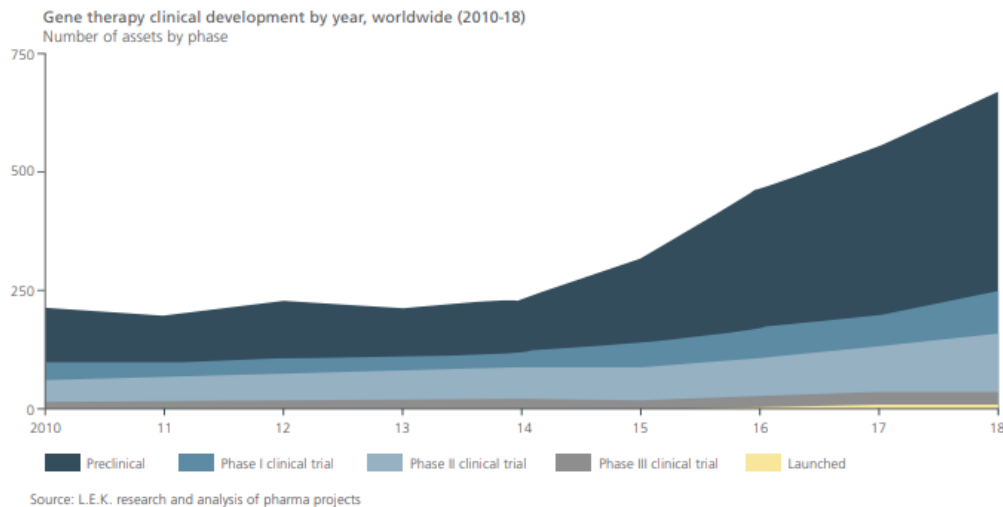


Figure 28 : Évolution du nombre d’essais cliniques de thérapie génique au cours du temps et répartition par phases¹⁰³

La figure 28, met en évidence le nombre d’essais cliniques au cours du temps, ainsi que la répartition par étape de développement.

Nous remarquons un développement important et récent de la thérapie génique à partir de 2014. Les technologies étudiées précédemment ainsi que les vecteurs développés ont permis à ces produits d’être plus efficaces et moins dangereux pour passer en phase clinique. De ce fait, la thérapie génique, notamment in vivo, s’est développée. L’augmentation depuis 2014 est linéaire et devrait donc se poursuivre dans les années à venir.

De plus, ce graphique met en évidence que la thérapie génique est une technique encore peu mature. En effet, la majorité des essais en cours sont encore en phase très précoce, phase préclinique.

Si nous nous concentrons sur les phases précliniques et la phase I, nous observons que l’émulation depuis 2014 se traduit en grande majorité par des projets précliniques. Ces projets précliniques se répercutent actuellement peu en phases cliniques. Nous pouvons cependant penser que du fait d’un nombre toujours croissant de travaux en préclinique, de nombreux essais cliniques devraient concerner la thérapie génique dans les années à venir.

Nous remarquons également que quelques projets en phase III devraient permettre d’augmenter le nombre de thérapies géniques commercialisées.

Dans ces essais, nous observons qu'actuellement, les vecteurs viraux sont prédominants dans les produits en développement (29).

Malgré les difficultés des vecteurs viraux notamment en termes de sécurité, ils sont les plus utilisés et donnent le plus de garantie à l'heure actuelle.

Concernant, les vecteurs viraux, les AAV dominent largement en nombre d'essais en cours. Nous avons vu précédemment que ce sont les vecteurs présentant le moins de risques. Nous avons également vu que le Zolgensma et le Luxturna utilisent également un vecteur AAV. Cependant pour certaines utilisations, ils ne sont pas adaptés, et d'autres vecteurs viraux sont donc utilisés, notamment un trio des Adénovirus et des Lentivirus.

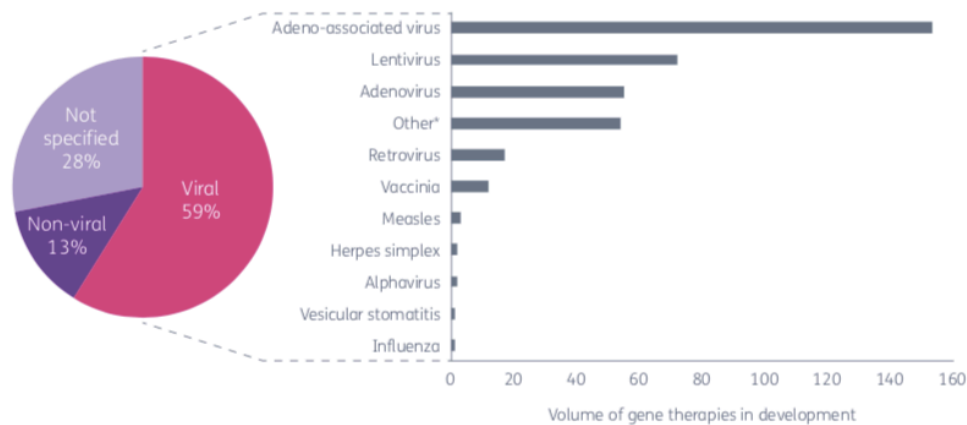


Figure 29 : Répartition des essais cliniques selon le type de vecteur utilisé¹⁰⁴

Enfin, si l'on s'intéresse aux aires thérapeutiques des traitements développés (figure 30), l'oncologie et les maladies rares dominent le pipeline. Nous noterons que certaines pathologies rares sont des cancers. Si l'on prend en compte ceci, l'oncologie domine le pipeline.

Ceci est intéressant à confronter avec les données des produits commercialisés. En effet, la très grande majorité des produits commercialisés concernent des pathologies rares. On observe donc que la thérapie génique change d'échelle pour traiter des pathologies ayant un nombre potentiel de patients bien plus important. Ce changement, entraîne des problématiques importantes pour les laboratoires notamment en termes de production. Ces problématiques seront traitées plus loin.

Nous noterons cependant, que de nombreuses aires thérapeutiques peuvent être traitées par thérapie génique.

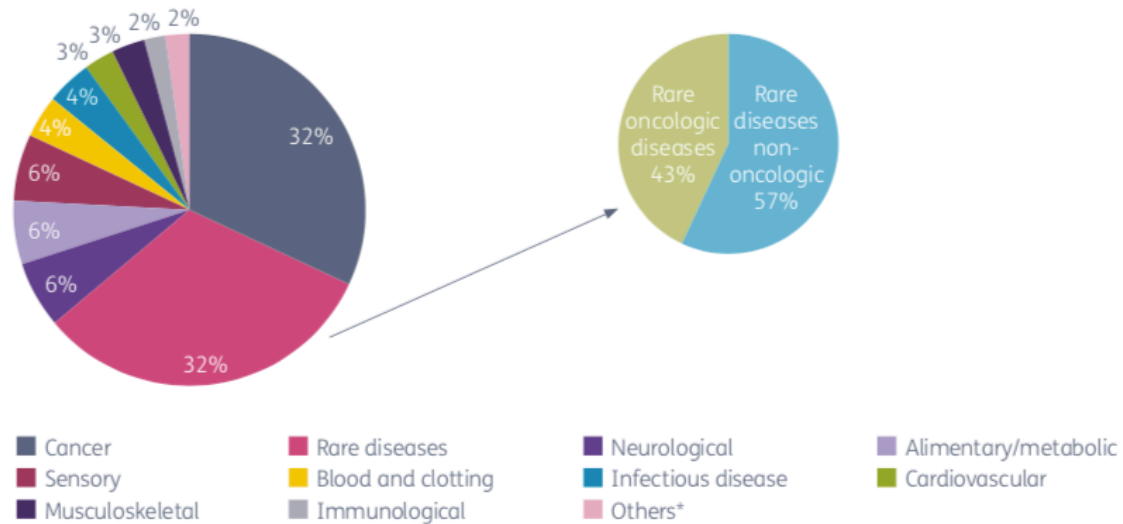


Figure 30 : Aires thérapeutiques des produits en développement

C- Les laboratoires développant des thérapies géniques

Nous allons maintenant nous intéresser aux sociétés qui développent les produits de thérapie génique.

La figure suivante (figure 31) met en évidence le top 20 des sociétés développant des produits de thérapie génique.

Il est intéressant de noter l'absence de Big Pharma dans cette représentation. En effet, la thérapie génique est une technique assez récente et qui possède de fortes spécificités. Les Big Pharma n'ont pas les outils ni les compétences en interne pour développer ce type de produits. Comme beaucoup d'innovations, les techniques de thérapie génique proviennent de travaux de recherche qui sont devenus des start-ups. Les industries pharmaceutiques n'ont pas encore développé les équipements adaptés.

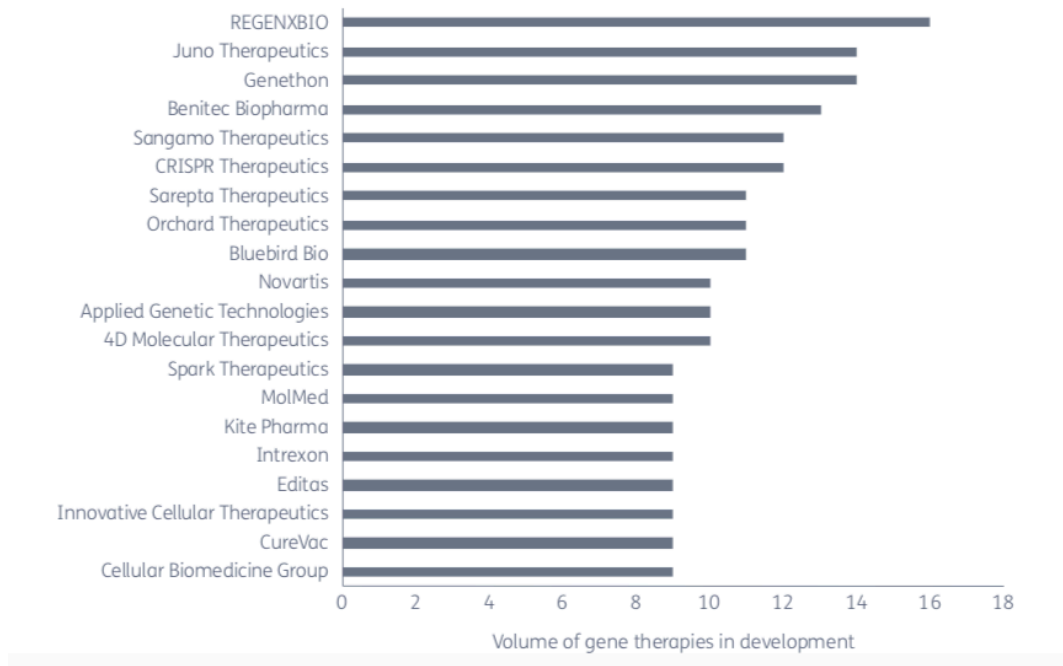


Figure 31 : Top 20 des sociétés développant des thérapies géniques

Depuis plusieurs années, les Big Pharma innovent par acquisition de Biotech innovantes ou encore en signant des partenariats avec celles-ci. Ce nouveau paradigme de R&D des Big Pharma se retrouve dans le développement d'autres types de médicaments biologiques (Anticorps, Thérapie cellulaire, etc.).

Cette nouvelle stratégie R&D, ainsi que la nouveauté de ces technologies, expliquent l'absence de Big Pharma dans ce top 20.

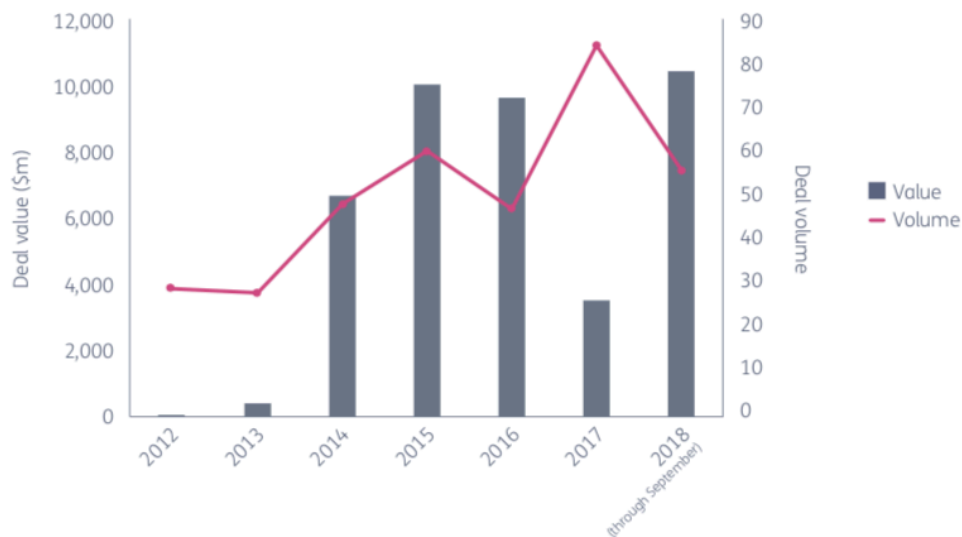


Figure 32 : Evolution des deals entre Biotech et BigPharma

La figure 32 met en évidence l'importance croissante au cours du temps des partenariats et des relations entre les Biotech et les BigPharma. Elle est en corrélation avec celle représentant le nombre d'essais au cours du temps. En effet, nous observons une augmentation des deals (en valeur et en volume) à partir de 2014. L'augmentation est spectaculaire et montre bien une rupture réalisée autour de 2014.

Comme nous l'avons vu plus haut, les médicaments commercialisés sont parfois le fruit de partenariat entre Biotech et BigPharma.

Les BigPharma agissent donc soit par rachat, soit par partenariat avec les Biotech.

Les principaux rachats sont :

- Le rachat de Kite Pharma par Gilead pour 11,9 milliards de dollars
- Le rachat de Juno therapeutics par Celgene pour 9 milliards de dollars
- Le rachat d'AveXis par Novartis pour 8,7 milliards de dollars
- Le rachat d'Audentes therapeutics par Astellas pour 3 milliards de dollars

Les principaux partenariats sont :

- Spark therapeutics et Novartis
- Pfizer et Cellectis

Le dernier accord de licence en date correspond à l'achat des droits du SRP-9001 de Sarepta par Roche. Le SRP 9001 est une thérapie génique in vivo expérimentale dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Ces partenariats sont intéressants pour les deux parties, car d'une part les BigPharma ont accès à des innovations qu'elles n'ont pas en interne, et d'autre part la Biotech s'appuie sur le maillage international de la BigPharma pour la commercialisation, ainsi que sur son expertise et son expérience notamment réglementaire.

Ceci met en évidence une nouvelle R&D de la part des BigPharma. Elle est externalisée avec des partenariats avec les Biotech mais aussi avec des financements de recherche publique.

Cette nouvelle stratégie des BigPharma est un peu plus ancienne que 2014. En effet, les partenariats et les rachats de Biotech sont devenus la locomotive de la R&D pharmaceutique

depuis les années 2000. La figure 33 met en évidence le nombre de molécules ayant obtenues une AMM étant à l'origine développées par des petites entreprises.

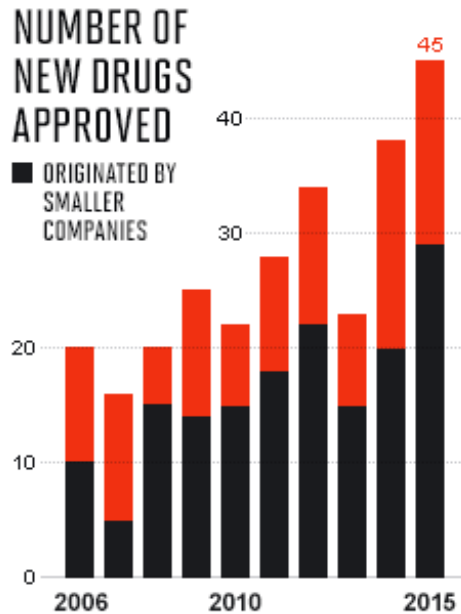


Figure 33 : Proportions de molécules commercialisées à l'origine développées par des petites entreprises. ¹⁰⁵

La thérapie génique s'appuie actuellement sur des technologies récentes. Les BigPharma se rapprochent des Biotech voir des équipes académiques pour développer des nouveaux produits.

Nous avons donc étudié de manière précise le marché actuel de la thérapie génique in vivo. Nous avons vu qu'il s'agit d'un marché encore jeune mais en pleine croissance. Cette croissance très importante fait naître chez les laboratoires des challenges qu'il faudra résoudre.

Nous allons donc voir dans la partie suivante les challenges actuels auxquels font face les sociétés de thérapie génique.

D- Les challenges menaçant la mise sur le marché des thérapies géniques

Nous avons vu que la thérapie génique in vivo est récente. Le marché est encore peu mature. Les laboratoires développant de produits font aujourd'hui face à des challenges pour développer de nouvelles thérapies.

Nous allons dans cette partie étudier ces challenges.

1- La production à grande échelle

Les thérapies géniques sont des produits biologiques. Le développement des produits biologiques a ouvert une nouvelle voie à l'industrie pharmaceutique, à bout de souffle avec les molécules chimiques.

Il s'agit d'un vrai changement de paradigme, avec de réelles différences entre les types de produits. La principale différence est dans le procédé de fabrication. Les médicaments biologiques sont obtenus à partir d'organismes vivants, tandis qu'historiquement, les médicaments chimiques sont obtenus par synthèse chimique.

Cette différence est également valable pour les produits de thérapie génique. Nous allons voir maintenant les grandes étapes de production d'un médicament de thérapie génique.

La bioproduction (production d'un médicament d'origine biologique) est généralement découpée en deux grandes phases : l'upstream et le downstream.

L'objectif de la phase downstream est de séparer le vecteur viral créé lors de la phase upstream des différentes impuretés produites. Cette étape permet également de formuler le virus dans une forme appropriée à l'administration aux patients.

Les méthodes de production des thérapies géniques sont évidemment spécifiques à chaque produit. Pour illustrer cette partie, nous allons donc nous intéresser à la bioproduction de thérapies géniques à vecteurs Adeno Associated Virus. Nous avons vu précédemment que ce sont les vecteurs les plus utilisés.

L'exemple de la production d'AAV permettra de comprendre la bioproduction des thérapies géniques.

Principes de production des thérapies géniques

Upstream

L'objectif général de la conception des vecteurs viraux est d'emballer efficacement le gène thérapeutique ou les nucléotides dans des particules virales infectieuses et d'éviter la génération de particules de type sauvage ou de particules vides.¹⁰⁶

La fabrication de vecteurs viraux nécessite plusieurs étapes de fabrication :

Premièrement, les matériaux nécessaires à la fabrication du vecteur viral thérapeutique doivent être générés.

La production des matières premières « starting materials » est difficile. Elle concerne principalement deux types de produits :

- Les plasmides codant pour les composés du virus et pour le gène thérapeutique
- Les cellules de production

La production de plasmide est complexe souvent à partir de bactéries. Ces plasmides produits, doivent répondre à des normes rigoureuses afin de s'assurer que le matériau résultant est exempt d'impuretés liées aux produits utilisés et au procédé.

La création d'une banque de cellules pour la transfection des plasmides est un procédé long et difficile. Le type cellulaire le plus souvent utilisé est la lignée cellulaire mammifère HEK 293.

L'étape suivante de la fabrication consiste à générer le vecteur viral souhaité. Les cellules qui permettront de créer le vecteur sont transfectées avec des plasmides pour générer le vecteur viral. Ces plasmides codent donc pour les composants du AAV et pour le gène thérapeutique. Dans le système, les particules virales s'assemblent.

Enfin, les vecteurs viraux sont récoltés. Les particules virales AAV s'accumulent dans le cytoplasme et le media, de sorte que le rendement total puisse être amélioré par lyse des cellules.¹⁰⁸ Le vecteur récolté est ensuite concentré, purifié, titré, caractérisé et stocké pour une utilisation. Ce qui correspond à la phase Downstream de production.

Cette méthode appelée la transfection transitoire est la méthode de référence actuellement. Il s'agit d'un mode très souple et efficace de production de vecteurs viraux. C'est une méthode rapide pouvant réduire le temps de développement et accélérer la mise sur le marché.¹⁰⁷

Cette méthode semble cependant présenter des limites pour la production de grandes quantités de vecteurs pour une utilisation clinique ou commerciale.

En effet, d'autres méthodes de fabrication existent. Chacune présente des défauts et des avantages. Nous nous sommes attardés sur la production transitoire en cellules HEK 293 car il s'agit de la méthode de référence pour la production de vecteurs AAV qui sont les plus utilisés à l'heure actuelle.

Beaucoup d'espoirs sont par exemple placés dans l'utilisation de production de vecteurs viraux à partir de « Stable Producer Cell Lines ». Avec cette méthode, les gènes permettant de produire les vecteurs viraux sont intégrés au génome de la cellule. Cela permet la production à plus grande échelle. C'est une technique prometteuse pour l'avenir.

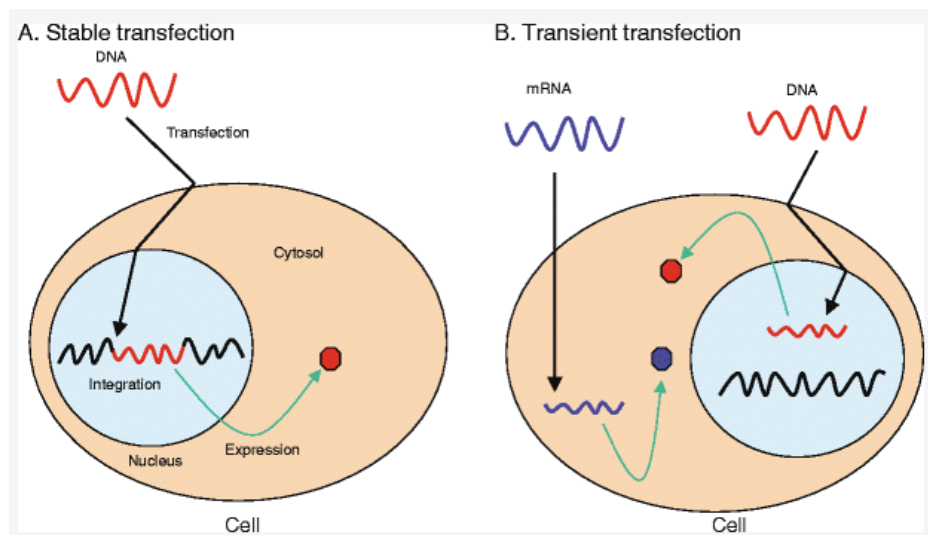


Figure 34 : Production transitoire Vs Production stable¹⁰⁹

Dans les applications ex-vivo, une étape supplémentaire est nécessaire. En effet, les cellules cibles du patient sont collectées et modifiées par introduction du vecteur viral. Après modification, les cellules sont récoltées, caractérisées et formulées avant l'administration. Cette étape n'existe pas dans les processus in vivo.

Downstream

L'étape downstream a pour objectif de séparer le vecteur viral des diverses impuretés produites lors du traitement en amont et de placer le virus dans l'état qui convient pour la formulation et

l'administration aux patients. Cette étape doit permettre d'obtenir un produit très pur sans dégrader des particules virales et perdre en rendement de production.

Évidemment les procédés à utiliser lors de cette phase de la bioproduction dépendent de la méthode de production utilisée en phase Upstream. Bien qu'il existe des spécificités, le protocole downstream suit une succession d'étape similaire.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour filtrer les impuretés et obtenir un produit final pur. Des méthodes physiques telles que les microfluidiseurs sont utilisées pour filtrer les macromolécules et les grosses impuretés. Ensuite de nombreuses techniques existent pour continuer la purification. Nous pouvons citer les méthodes de centrifugation ; chromatographie ; chromatographie par échanges d'ions. ¹¹⁰

Le challenge important de cette étape est de maintenir un rendement important. Il s'agit d'un enjeu important des acteurs de la bioproduction. Il faut également qu'aucun contaminant externe ne soit introduit durant cette étape.

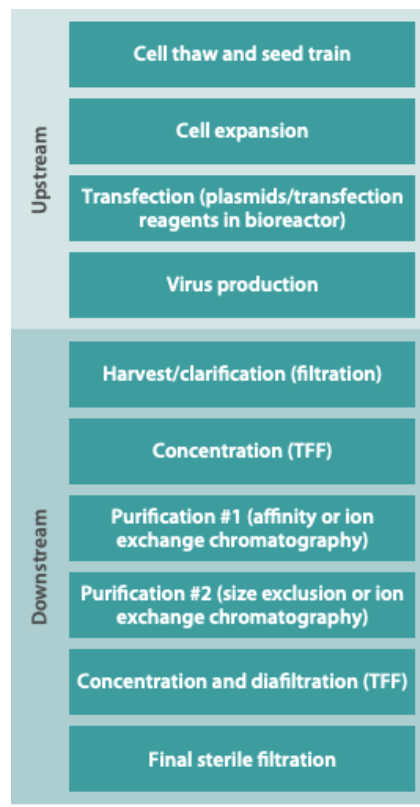


Figure 35 : Différentes étapes de production d'un vecteur viral¹¹¹

Production des thérapies géniques : Le passage à l'échelle industrielle

Un des grands challenges à l'heure actuelle pour les développeurs de thérapies géniques est de pouvoir passer à des échelles de production plus importantes.

Aujourd'hui, les capacités de production des thérapies géniques sont très limitées. Avec de nombreux essais cliniques de phase III en cours, les capacités de production vont devoir s'adapter pour ne pas bloquer le développement de ces thérapies.

De plus, la thérapie génique est historiquement utilisée pour des maladies génétiques rares donc avec peu de patients. Aujourd'hui elle se développe pour des pathologies plus fréquentes qui demanderont des capacités de production plus importantes également.

Deux phénomènes sont responsables de ces capacités limitées : des techniques de production à améliorer et des usines de production insuffisantes.

Développer des techniques de production plus efficaces

Les techniques de production de thérapie génique actuelles ne sont pas adaptées à un passage à des échelles de production supérieures.

Pour pallier cette limite, des nouvelles méthodes de productions sont mises au point. Par exemple, UniQure a amélioré ses capacités de production en utilisant une suspension de cellules d'insectes SF9 pour produire le vecteur viral.¹¹² Plutôt que d'introduire les gènes nécessaires à la production de vecteurs par transfection, les cellules SF9 sont infectées à l'aide de baculovirus recombinants portant les gènes du génome, de la capsid et du helper du vecteur.

Ces rendements faibles sont engendrés par les procédés upstream et downstream de production. En effet, les techniques de purification utilisées dans les phases downstream ne permettent d'obtenir que des rendements très faibles de récupération virale.¹¹⁴ L'amélioration des phases downstream permettront également d'améliorer les rendements de production et donc indirectement les quantités produites. Ce changement d'échelle implique dans les phases de purification des larges volumes, des bons rendements et de la rapidité.

D'autres systèmes existent et se développeront à l'avenir. Ces nouveaux systèmes permettront de produire en grande quantité pour des phases plus avancées (cliniques et commerciales).

Aujourd'hui, les thérapies géniques ont besoin d'une méthode de fabrication standardisée. Une technologie qui permettra la production « scalable », de plusieurs lots avec une faible variabilité. Cette difficulté est analogue à celle des anticorps monoclonaux il y a une vingtaine d'années. Aujourd'hui, la production d'anticorps monoclonaux est standardisée, elle le sera pour la thérapie génique dans quelques années.

Développer les capacités de production

Nous avons précédemment précisé que la majorité des laboratoires actuels de thérapie génique actuels sont des petites Biotech, elles-mêmes souvent des spin-off d'instituts de recherche. Au-delà des procédés de fabrication qui permettent des rendements faibles, les usines elles-mêmes ne possèdent pas les équipements permettant de passer à l'échelle et produire pour des pathologies fréquentes avec beaucoup de patients potentiels.

Il s'agit dans un premier temps d'un manque d'usines et d'unités de production capables de produire des médicaments de thérapie génique.

Les Bigpharma n'ont pas non plus développé des capacités de production suffisantes. Peu de laboratoires ont développé des capacités internes. Spark Therapeutics produit le Luxturna® « in house »¹¹⁴ avec ses propres capacités de production. Avexis possède également des capacités de production propre.¹¹⁵

Aujourd'hui, ce sont les CMO (Contract Manufacturing Organisations) qui produisent la majorité des thérapies géniques pour le compte de tiers. Mais là encore, les capacités sont limitées.

A l'heure actuelle, il existe peu de CMO dans le monde produisant des produits de thérapie génique.

Cette difficulté de production pourrait limiter l'innovation et se répercuter sur les patients. En effet, si le manque de capacité de production n'est pas pallié, les Biotech qui développent des produits ne pourront pas produire. Cette incapacité ralentirait le développement de nouveaux produits.

Pour pallier à cette limite, des nouvelles usines doivent voir le jour. Mais elles doivent posséder des spécificités pour s'adapter à ces traitements particuliers.¹¹⁶

En effet, historiquement, la stratégie des industriels pour produire à plus grande échelle était de faire du « scale up ». Le « scale up » consiste à agrandir la taille des bioréacteurs pour produire plus.

Aujourd'hui, une nouvelle stratégie apparaît, le « scale out ». Le « scale out » consiste à garder des bioréacteurs de petite taille, mais à en augmenter le nombre. Cette nouvelle stratégie est possible grâce au développement des technologies « single use ». ¹¹⁷

Comme son nom l'indique, le « single use » consiste à utiliser des articles à usage unique lors de la production des thérapies.

L'utilisation des technologies « single use » a plusieurs avantages :

- Des économies de temps et d'argent sont réalisées en éliminant la nécessité de nettoyer et de recycler l'équipement
- Réduire les risques de cross-contamination
- Une grande flexibilité : A l'heure de la médecine personnalisée, des technologies jetables permettent aux entreprises d'être plus flexibles dans leur production

Cette stratégie « scale out », permet :

- D'être plus flexible vis à vis de la demande
- Réduire le risque : En effet, avec des technologies « scale up », l'environnement de production change. Les milieux ne sont plus les mêmes ce qui impact la qualité du système. De plus, s'il y a un problème de bioréacteur, l'impact peut être important. En utilisant une technique scale out, ces risques sont réduits.

A terme, nous aboutirons à des usines flexibles qui seront adaptées en temps réel à la demande. En cas de forte demande, de nouveaux bioréacteurs peuvent être utilisés, dans le cas inverse, l'activité de production peut être ralentie.

Cette stratégie peut être parfaitement adaptée à la thérapie génique car potentiellement, si la thérapie génique est efficace, les patients traités sont guéris. Les besoins en production seront importants au lancement du produit, puis à terme les besoins seront équivalents à l'incidence de la maladie traitée.

Enfin, les nouvelles technologies telles que l'intelligence artificielle pourront permettre également d'améliorer les rendements de production en ayant un suivi en temps réel de la production.

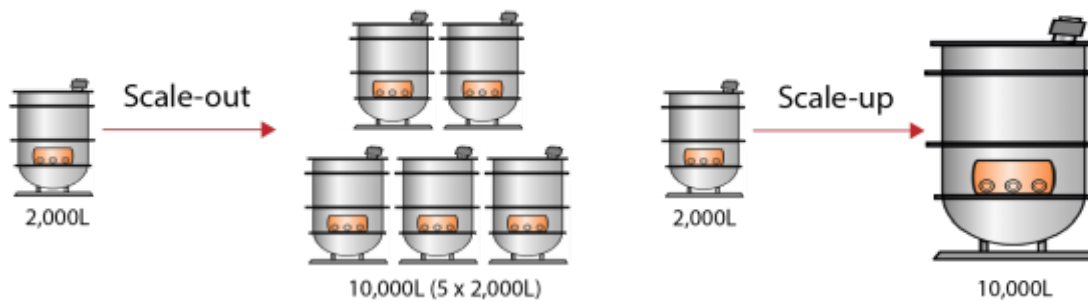


Figure 36 : Scale Up Vs Scale Out¹¹⁸

Situation de la bioproduction en France

Les capacités de production de thérapie génique en France sont également limitées.

Une étude du Leem publiée en 2018 recense 32 sites de bioproduction en France.

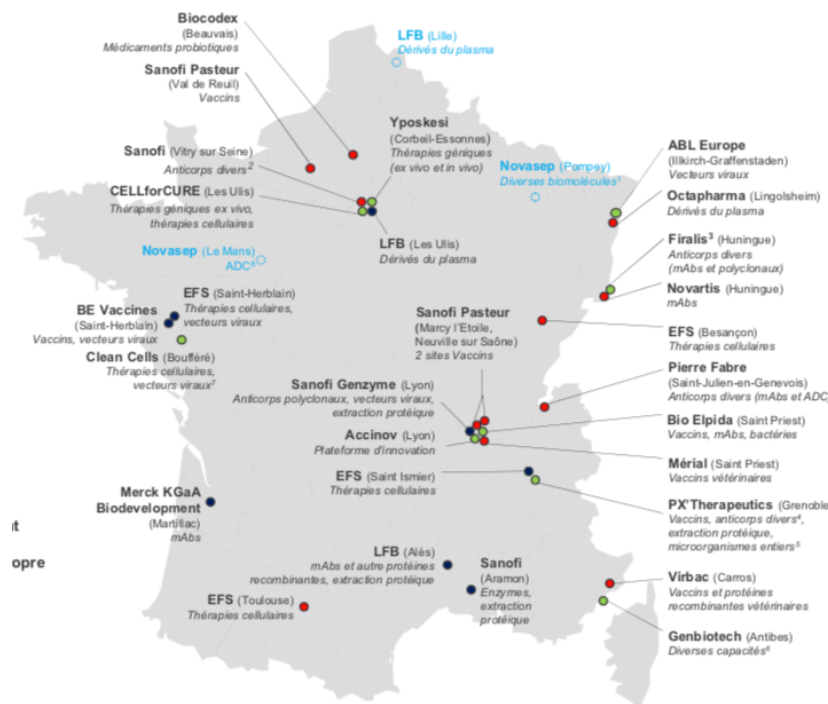


Figure 37 : Représentation des bioproducteurs en France¹²⁰

Selon cette même étude, la bioproduction emploie 8 463 personnes en France.

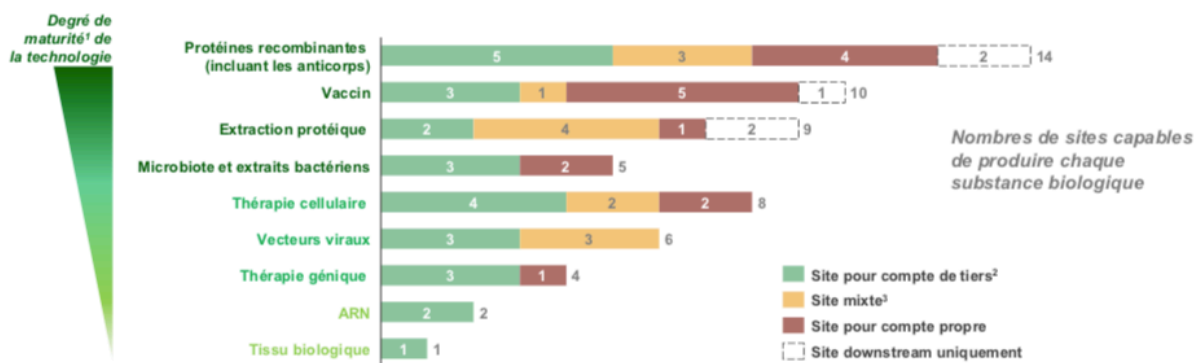


Figure 38 : Nombre de sites capables de produire pour chaque technologie

Si nous nous intéressons particulièrement à la thérapie génique, cette étude met en évidence une filière moins mature que pour d'autres types de produits biologiques. La bioproduction Française, est tirée par la production de protéines recombinantes et notamment les Anticorps.

En ce qui concerne les capacités de production de thérapie génique en France et plus particulièrement de thérapies géniques in vivo, elles sont peu étendues. Peu d'acteurs sont capables de produire des thérapies géniques en France. Nous pouvons citer ABL Europe ou encore Sanofi Genzyme qui sont capables de produire des vecteurs viraux.

Nous pouvons également citer la société Yposkesi qui a été créée à partir de l'AMF-Téléthon et qui est financée par un investissement public de la BPI (Banque Publique d'Investissement) à travers un Programme d'Investissement d'Avenir. Le Programme d'investissement d'avenir (PIA), a été mis en place par l'État pour financer des investissements innovants et prometteurs sur le territoire, afin de permettre à la France d'augmenter son potentiel de croissance et d'emplois.

Cette implication de l'État dans la production des médicaments biologiques montre qu'il s'agit d'une filière d'avenir. Le 8^{ème} Conseil stratégique des industries de santé (CSIS) qui a eu lieu le 10 juillet 2018, présidé par le premier ministre Edouard Philippe, a fait de la bioproduction un enjeu majeur du développement économique de la France.¹²¹

Nous pouvons imaginer que plusieurs traitements de thérapie génique vont voir le jour. La filière de la bioproduction devra s'adapter à l'augmentation de la demande.

Utiliser des techniques de production automatisées

A l'heure actuelle, les techniques de production des thérapies géniques sont largement manuelles. Il y a peu de nouvelles technologies utilisées pour automatiser la production¹¹⁹. Dans les médicaments historiques, chimiques, les chaînes de production sont entièrement automatisées. Dans certains médicaments biologiques plus anciens également. En ce qui concerne la thérapie génique, ce n'est pas le cas. Ce manque d'automatisme rend la production des thérapies géniques sujette aux erreurs humaines et à des variabilités inter lots. De plus le prix est également plus élevé.

Cette difficulté est due au fait qu'il ne s'est pas encore développé des techniques de production standard, qui pourraient être automatisées.

Les processus automatisés peuvent réduire les variabilités et permettre un suivi du procédé de fabrication.

L'automatisation et les nouvelles technologies ont la possibilité de changer la façon de produire les thérapies géniques et permettre le passage à des échelles de production supérieures.

A l'heure actuelle, les capacités de production de thérapies géniques sont très insuffisantes. Elles ne sont pas adaptées à la demande. Ces difficultés de production expliquent en partie le prix de ces thérapies. Ce prix pose également des problèmes que nous verrons dans la partie suivante.

Cependant, les sociétés sont évidemment conscientes de ces limites et investissent beaucoup pour les dépasser. De nombreuses usines voient le jour dans le monde du fait des investissements des BigPharma.

2- Les difficultés de la chaîne d'approvisionnement

La chaîne d'approvisionnement des produits de thérapie génique est un challenge important pour les laboratoires. En effet, qu'elle soit in vivo ou ex vivo, la thérapie génique pose des problèmes de « supply chain ».

Dans une utilisation ex vivo, les cellules du patient sont prélevées puis modifiées puis réinjectées. Évidemment ce transport de cellules est extrêmement complexe et pose de gros problèmes aux laboratoires. Dans le cas de la thérapie génique ex vivo, la chaîne d'approvisionnement n'est plus linéaire du laboratoire pharmaceutique vers le patient, mais circulaire du patient au patient en passant par le laboratoire pharmaceutique.

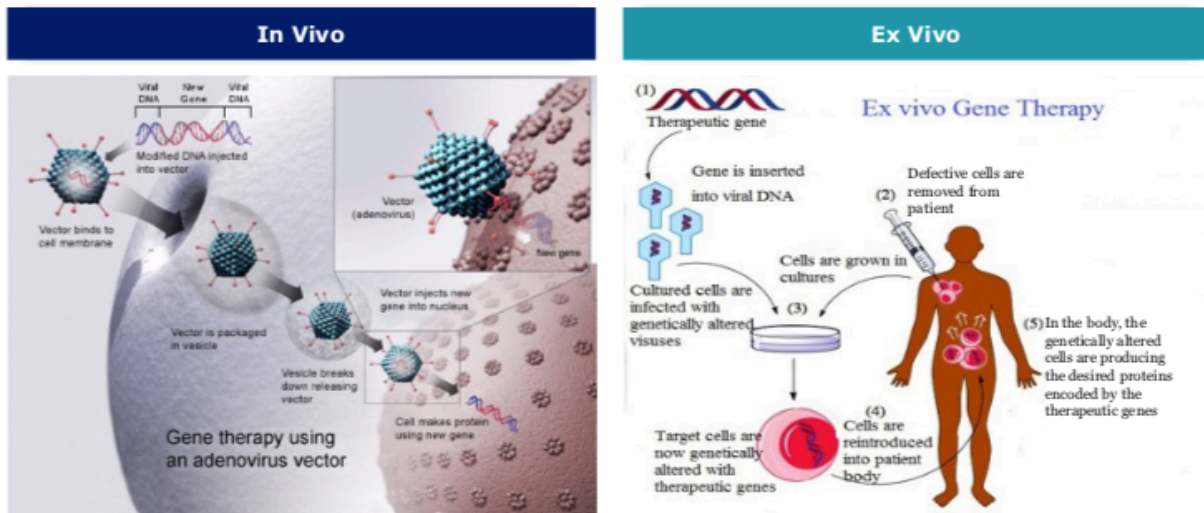


Figure 39 : Stratégie In vivo Vs Ex vivo

Dans le cas de la thérapie in vivo, il n'y a, par définition, pas de prise en charge des cellules du patient. La « supply chain » des thérapies géniques implique :

- La production du gène thérapeutique
- La création du vecteur (viral ou non)
- La délivrance aux patients

De ce fait, la « supply chain » est facilitée. Cependant elle n'est pas évidente. En effet, il s'agit de thérapies biologiques. Les transports et les périodes de stockages se font dans des conditions strictes (souvent entre -40°C et -70°C pour les vecteurs viraux) et de plus ces produits ont une durée de vie très limitée. Le transfert vers les patients est un enjeu important pour les laboratoires.

Les différents acteurs impliqués dans la chaîne de distribution doivent être parfaitement connectés et synchronisés.

3- Prix et remboursement des médicaments de thérapie génique

Nous avons vu précédemment l'impact thérapeutique énorme que peut avoir la thérapie génique. Les nouvelles technologies développées ouvrent la voie à des traitements qui étaient jusqu'ici impossibles.

Cependant, le prix de ces traitements est particulièrement élevé.

La première cause de prix élevé est la difficulté de production. Nous l'avons vu précédemment, il n'existe pas de méthode de production standardisée, ce qui fait augmenter le prix.

Mais il faut prendre en compte également que ces nouveaux traitements ont un impact sur le modèle économique des sociétés pharmaceutiques. En effet, le « business model » des laboratoires sera différent avec les médicaments de thérapie génique.

Certains traitements ont le potentiel de guérir le patient en une seule administration. Nous pouvons penser que si le médicament fonctionne, il traitera le pool de patients dans le monde. A terme, il restera à traiter uniquement les nouveaux patients diagnostiqués. Ainsi rentabilité à long terme du laboratoire pharmaceutique est menacée.

C'est la promesse faite par Novartis pour le Zolgensma® qui traite l'amyotrophie musculaire spinale (SMA). Il est commercialisé aux USA depuis 2019 au prix de 2 millions de Dollars. Novartis explique ce prix et le compare au « standard of care » jusqu'alors. En effet, avant le Zolgensma® le médicament utilisé était le Spinraza® qui est commercialisé à 70 000 euros la dose. Cependant, il nécessite plusieurs administrations estimées à 4 millions de dollars sur 10 ans par Novartis. A ce titre, sur le long terme, le Zolgensma® serait moins couteux.

Ces prix élevés s'expliquent donc, mais ils représentent néanmoins un obstacle majeur pour les payeurs.

Dans la santé, les payeurs désignent généralement des entités autres que le patient qui financent ou remboursent le coût des services de santé. Dans la plupart des cas, ce terme désigne les sociétés d'assurance, les tiers payeurs ou les promoteurs de régimes de soins de santé. Ils peuvent être publics ou privés.

Le prix très élevé n'est pas la seule interrogation des organismes payeurs. En effet, la difficulté majeure est la différence entre les données obtenues lors des essais cliniques et précliniques et l'effet réel au sein de la population. Dans la plupart des cas, il s'agit de traitements contre des

pathologies rares. De ce fait les cohortes de patients dans les essais cliniques sont peu importantes. Il est difficile de prédire l'efficacité du traitement sur le marché.

De plus les laboratoires expliquent le tarif très élevé pour une efficacité immédiate du traitement. Cependant nous n'avons que peu de recul sur ces technologies, l'efficacité à long terme est difficile à prévoir. Les payeurs sont peu enclins à rembourser les frais car ils n'ont pas de preuve sur cet effet à long terme.

Le prix très élevé des thérapies géniques ainsi que ces incertitudes sur l'efficacité interrogent les payeurs sur le bien-fondé d'un remboursement.

De ce fait, les mécanismes classiques de remboursements utilisés jusqu'à présent ne sont pas adaptés aux médicaments de thérapie génique. Plusieurs modèles alternatifs sont possibles :

- Les paiements pourraient être étalés sur une période de temps. Cette possibilité permettrait aux payeurs de moins ressentir financièrement le coût de ces traitements.
- Un modèle basé sur les résultats : Le payeur ne paierait qu'une partie du prix total à l'avance. Si le patient obtient les résultats cliniques attendus, le payeur paierait le reste du prix. Ce modèle répartirait donc le risque entre le payeur et le fabricant. Sur le même principe, le payeur paierait entièrement le prix mais il serait remboursé si le produit n'a pas l'effet escompté.

D'autres modèles peuvent exister ou pourront voir le jour rapidement car il s'agit d'une limite importante au développement de médicaments de thérapie génique.

V- Conclusion

Nous avons vu dans ce travail, que la thérapie génique in vivo est en pleine croissance.

Les difficultés cliniques restent cependant importantes pour les médicaments de thérapie génique in vivo notamment en ce qui concerne la délivrance ciblée et l'immunogénicité. L'amélioration des vecteurs devrait permettre de palier à ces problèmes et de faciliter la mise sur le marché de nouveaux traitements.

A travers ce rapport, nous avons également vu que les médicaments de thérapie génique sont des médicaments particuliers. En effet, leurs mécanismes d'action et les risques associés ont poussé les autorités réglementaires à créer un cadre réglementaire spécifique dans le but de favoriser la sécurité des patients.

Il doit également permettre aux laboratoires de mettre sur le marché dans les meilleurs délais des médicaments innovants apportant des solutions à des malades parfois en impasse thérapeutique.

Plusieurs aspects rendent la décision de mise sur le marché complexe :

- Balance bénéfice/risque difficile à juger : Le manque de recul sur ces thérapies rend difficile le jugement sur l'efficacité et l'absence de risques à long terme de ces médicaments.
- Il s'agit de traitements utilisés souvent dans des pathologies rares. De ce fait, l'évaluation clinique concerne peu de patients ce qui complique le passage dans la population générale

Nous avons vu que ce cadre réglementaire manque d'uniformité à l'échelle internationale. Ce manque d'uniformité se répercute sur les sociétés en complexifiant leurs démarches réglementaires et sur les patients en retardant la mise sur le marché.

Actuellement peu de médicaments sont déjà sur le marché. En effet, les produits commercialisés et en développement s'appuient sur des technologies très récentes. De nombreux travaux sont en cours pour les améliorer. Des nouvelles technologies devraient apparaître dans les années à

venir. Il pourrait s'agir de nouveaux vecteurs présentant moins de risques ou encore de nouvelles technologies de « gene editing ».

Ces nouvelles thérapies devront être produites à grande échelle. Il s'agit à l'heure actuelle de la limite majeure au développement de ces technologies.

En ce qui concerne la France, des efforts doivent être faits pour développer les capacités de productions adaptées. Dans cette concurrence internationale, les compétences de la main d'œuvre sont un élément clé. En effet, les laboratoires doivent soutenir cette croissance rapide, la main d'œuvre qualifiée donnera un avantage au pays qui saura la développer.

Des stratégies de remboursement innovantes et spécifiques à ce type de traitements devront être mises au point.

De même, une filière devra se mettre en place pour permettre une « supply chain » adaptée pour les patients.

L'évolution de la thérapie génique in vivo sera à suivre dans les années à venir et devrait apporter des nouveaux traitements d'intérêt majeur dans les prochaines années.

VI- Bibliographie

1-Rhawn Joseph,Ph.D ; Genetics and Evolution of Life From Other Planets ; Cosmology, 2009, Vol 1, 150-200

2-Université d'Anger : La synthèse des protéines.

<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/>

1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

3- Giulliana Augusta Rangel Gonçalves, Raquel de Melo Alves Paiva. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *einstein*. 2017;15:369-75

4- Loi n° 94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain

5- Site internet de l'INSERM : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

6- « Gene therapy » on PubMed

7 - Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante

8- DIRECTIVE 2001/83/CE du parlement européen et du conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain

9- Site de l'ANSM : [https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-trois-types-de-produits-les-MTI-les-MTI-PP-et-les-preparations/\(offset\)/2](https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-trois-types-de-produits-les-MTI-les-MTI-PP-et-les-preparations/(offset)/2) (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

10- 21 May 2015 EMA/CAT/600280/2010 rev.1 Committee for Advanced Therapies Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products

11- Site de l'INSERM : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/medicament-developpement> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

12- RÈGLEMENT (UE) No 536/2014 du parlement européen et du conseil du 16 avril 2014 relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain

13- Site de l'INSERM <https://www.inserm.fr/recherche-inserm/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

14- Site de l'ANSM : <https://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Repertoires-des-essais-cliniques-de-medicaments/Repertoires-des-essais-cliniques-de-medicaments/Glossaire-relatif-aux-essais-cliniques> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

15 : Laurence Fluckiger - Rencontres avec l'ANSM – Réunion d'information 29 juin 2015 – Règlement (UE) n°536/2014^[1] relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE. Les points essentiels

16 : Site de l'ANSM [https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/\(offset\)/4](https://www.ansm.sante.fr/L-ANSM/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Les-medicaments-de-therapie-innovante-MTI-ATMP/(offset)/4) (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

17 : Site de l'agence régionale de santé <https://www.auvergne-rhone-alpes.ars.sante.fr/le-comite-de-protection-des-personnes-cpp> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

18 : LegiFrance : Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 relatif aux recherches impliquant la personne humaine

19 : Code de santé publique / Site légifrance

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665>
(*Dernière consultation le 02/02/2020*)

20 : Site du Haut conseil des Biotechnologies

<http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/demarche/cas-particulier-dossiers-recherche-biomedicale-veterinaire-produits-therapie-genique-ou-0> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

21 : Site l'ARS <https://www.ars.sante.fr/comite-de-protection-des-personnes-1> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

22 : Avis aux promoteurs d'essais cliniques de médicaments y compris les essais cliniques portant sur les médicaments de thérapies innovantes (MTI) version 1.1 En date du 01/06/2015

23 : Guide pratique d'information pour les demandeurs : Essais cliniques de médicaments (dont les médicaments de thérapie innovante) déposés dans le cadre de la procédure Fast-Track auprès de l'ANSM 18 février 2019 - Version 2.0

- 24 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/clinical-trials/clinical-trial-regulation> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 25 : Site de l'EMA : https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/delivery-time-frame-eu-portal-eu-database_en.pdf (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 26 : Site de l'EMA : <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/clinical-trials/clinical-trial-regulation> / Clinical Trials Information System development (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 27 : Site de l'ICH <https://www.ich.org/page/ctd> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 28 : ICH Topic M 4 Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Organisation CTDF
- 29 : Site de l'ANSM [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/L-AMM-et-le-parcours-du-medicament/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/L-AMM-et-le-parcours-du-medicament/(offset)/0) (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 30 : Overview of the EMA and the centralised procedure. Chaîne Youtube de l'EMA.
- 31 : EMA - Procedural advice on the evaluation of advanced therapy medicinal product in accordance with Article 8 of Regulation (EC) No 1394/2007
- 32 : Site de l'EMA : <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/supporting-smes> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 33 : Site de l'EMA [https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/innovation-medicines#ema's-innovation-task-force-\(itf\)-section](https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/innovation-medicines#ema's-innovation-task-force-(itf)-section) (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 34 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/advanced-therapies/advanced-therapy-classification> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 35 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/prime-priority-medicines> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 36 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/orphan-designation-overview> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 37 : Orphanet - https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=FR (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

- 38 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 39 : Site de l'EMA : <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/paediatric-medicines-overview> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 40 : EMA – Guideline on safety and efficacy follow up – risk management of advanced therapy medicinal products
- 41 : Site du Leem / <https://www.leem.org/la-therapie-genique> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 42 : Xavier M. Anguela and Katherine A. High ; Entering the Modern Era of Gene Therapy ; *Annu. Rev. Med.* 2019.70:273-288
- 43 : A. N. Lukashev and A. A. Zamyatnin, Jr ; Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives ; ISSN 0006-2979, *Biochemistry (Moscow)*, 2016, Vol. 81, No. 7, pp. 700-708. [SEP]
- 44 : Pierre Lehn ; Vecteurs rétro viraux [SEP] pour le transfert de gènes dans le tissu [SEP] hématopoïétique in vivo. *Médecine/sciences* 1990 ; 6 : 791-9
- 45 : Youngsuk Yi, Moon Jong Noh and Kwan Hee Lee ; Current Advances in Retroviral Gene Therapy *Current Gene Therapy*, 2011, 11, 218-228
- 46 : Kalpana GV ; Retroviral vectors for liver-directed gene therapy ; *Semin Liver Dis.* 1999; 19(1):27-37.
- 47 : Adenovirus: The First Effective *In Vivo* Gene Delivery Vector ; *Hum Gene Ther.* 2014 Jan 1; 25(1): 3–11. doi: 10.1089/hum.2013.2527
- 48 : Pasqualina Colella, Giuseppe Ronzitti, and Federico Mingozzi ; Emerging Issues in AAV-Mediated ; In Vivo Gene Therapy [SEP] ; *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* Vol. 8 March 2018 a 2017
- 49 : Indu Rajapaksha, Peter Angus and Chandana Herath (November 5th 2018). Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Disorders of Inherited and Non-Inherited Origin, In Vivo and Ex Vivo Gene Therapy for Inherited and Non-Inherited Disorders, Houria Bachtarzi, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.80317.
- 50 : Kreiss, P - Scherman, D, Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique., *Med Sci (Paris)*, 1999, Vol. 15, N° 5; p.669-76

- 51 : Kaustubh A.JinturkarMohan N.RathiAmbikanandanMisra ; Gene Delivery Using Physical Methods ; Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics ; 2011, Pages 83-126
- 52 : Gayong Shim, Dongyoon Kim, Quoc-Viet Le, Gyu Thae Park, Taekhyun Kwon and Yu-Kyoung Oh ; Nonviral Delivery Systems for Cancer Gene Therapy: Strategies and Challenges ; Current Gene Therapy, 2018, 18, 3-20
- 53 : Kim SY, Lee MK, Lim SJ. Current advances in developing cationic lipid-based nanoparticles as a vehicle for improving adenoviral gene delivery. J Pharm Inv 2016; 46(4): 393-402.
- 54 : Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, *et al.* A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. Nat Bio- technol 2008; 26(5): 561-9.
- 55 : Sarisozen C, Pan J, Dutta I, Torchilin VP. Polymers in the co- delivery of siRNA and anticancer drugs to treat multidrug-resistant tumors. J Pharm Inv 2017; 47(1): 37-49 [SEP]
- 56 : Murali raMaMoorth, aparna narveKar ; Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview ; Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015 Jan, Vol-9(1): GE01-GE06
- 57 : Al-Dosari MS, Gao X. Non viral gene delivery: Principle, limitations and recent progress. AAPS J. 2009;11(4):671-81 [SEP]
- 58 : Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E ; In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA ; Biochim Biophys Acta. 1991 Jan 17; 1088(1):131-4.
- 59 : Carmela Zincarelli, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo and Joseph E Rabinowitz ; Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection ; Molecular Therapy vol. 16 no. 6, 1073–1080 june 2008
- 60 : Gene therapy: an overview of approved and pipeline technologies. Ottawa: CADTH; 2018 Mar. (CADTH issues in emerging health technologies; issue 171)
- 61 : Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* 13, 759–780 (2014) doi:10.1038/nrd4278
- 62 : ZeljkaTrepotec EvaLichteneggerChristianPlankManish K.Aneja CarstenRudolph Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases ; Molecular therapy ; Volume 27, Issue 4, 10 April 2019, Pages 794-802

- 63 : Site de la Cystic Fibrosis Foundation ; Gene therapy for cystic fibrosis
<https://www.cff.org/Research/Research-Into-the-Disease/Restore-CFTR-Function/Gene-Therapy-for-Cystic-Fibrosis/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 64 : Tamura R, Miyoshi H, Yoshida K, Okano H, Toda M ; Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma ; *Neurosurg Rev.* 2019 Nov 28. doi: 10.1007/s10143-019-01203-3.
- 65 : Kerstin B. Kaufmann, Hildegard Buning, Anne Galy, Axel Schambach, Manuel Grez ; Gene therapy on the move ; *EMBO Mol Med* (2013) 5, 1642–1661
- 66 : Site de Huntington's Outreach Project for Education at Stanford ;
<https://hopes.stanford.edu/antisense-gene-therapy/#how-does-antisense-gene-therapy-work>
(Dernière consultation le 02/02/2020)
- 67 : Jian-zhong Xu, Jun-lan Zhang, Wei-guo Zhang ; Antisense RNA: the new favorite in genetic research ; *J Zhejiang Univ Sci B.* 2018 Oct; 19(10): 739–749.
 doi: 10.1631/jzus.B1700594
- 68 : Site de IDT Core Values
<https://eu.idtdna.com/pages/products/functional-genomics/antisense-oligos> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 69 : Claude Hélène Ester Saison-Behmoaras ; La stratégie antisens : nouvelles approches thérapeutiques ; *medecine/sciences* 1 994; JO: 253-73
- 70 : Kawasaki H., Taira K. Short hairpin type of dsRNA that are controlled by tRNAVal promoter significantly induce RNAi- mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res.* (2003), **31**, 700-707
- 71 : Zeng Y ., Cullen B.R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm *RNA* (2002), **8**, 855-860
- 72 : Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. & Sharp, P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 457–467 (2003)
- 73 : Melone, Mariarosa et Al. The carnitine system and cancer metabolic plasticity
 10.1038/s41419-018-0313- *Cell Death & Disease*
- 74 : Site de l'INSERM : <https://www.inserm.fr/en/health-information/health-and-research-from-z/genome-editing> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

- 75 : Barbara Dupret, Pierre-Olivier Angrand ; L'ingénierie des génomes par les TALEN ; médecine/sciences 2014 ; 30 : 186-93
- 76 : Frederic Paques, Philippe Duchateau ; Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy ; Current Gene Therapy ; Volume 7 , Issue 1 , 2007
- 77 : S.Arnould et Al. The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy ; Protein Engineering, Design & Selection vol. 24 no. 1–2 pp. 27–31, 2011
- 78 : Dana Carroll ; Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases ; Genetics, Vol. 188, 773–782 August 2011 773
- 79 : David Benjamin Turitz Cox, Randall Jeffrey Platt & Feng Zhang ; Therapeutic genome editing: prospects and challenges ; Nature Medicine | Volume 21 | Number 2 | February 2015
- 80 : Wei-Jing Dai, Li-Yao Zhu, Zhong-Yi Yan, Yong Xu, Qi-Long Wang and Xiao-Jie Lu ; CRISPR-Cas9 for *in vivo* Gene Therapy: Promise and Hurdles ; Molecular Therapy—Nucleic Acids (2016) 5, e349; doi:10.1038/mtna.2016.58
- 81 : Site du CNRS : <https://lejournal.cnrs.fr/articles/crispr-cas9-des-ciseaux-genetiques-pour-le-cerveau> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 82 : Hélène Gilgenkrantz ; La révolution des CRISPR est en marche ; m/s n° 12, vol. 30, décembre 2014 DOI : 10.1051/medsci/20143012004
- 83 : Sayed-Ahmed MZ, Makeen HA, Elsherbini MM, Syed NK, Shoeib SM (2018) Oncolytic Viruses: A gene Therapy for Treatment of Cancer in Companion Animals. Health Sci J Vol.12.No.4:579.
- 84 : Hiroshi Fukuhara Yasushi Ino and Tomoki Todo ; Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn ; Cancer Sci 2016 Oct; 107(10): 1373–1379.
- 85 : Nande R, Howard C, Claudio PP ; Ultrasound-mediated oncolytic virus delivery and uptake for increased therapeutic efficacy: state of art ; 25 November 2015 Volume 2015:4 Pages 193—205
- 86 : Site de l'INSERM : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/c-est-quoi/c-est-quoi-car> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 87 : EBioMedicine ; Natural killer cells for cancer immunotherapy: a new CAR is catching

up ; EBioMedicine 39 (2019) 1–2

88 : Shiwani Agarwal, Tatjana Weidner, Frederic B. Thalheimer & Christian J.

Buchholz (2019) *In vivo* generated human CAR T cells eradicate tumor cells, *OncoImmunology*, 8:12, DOI: 10.1080/2162402X.2019.1671761

89 : Joost van Haasteren, Stephen C. Hyde and Deborah R. Gill ; Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future ; Expert opinion on biological therapy 2018, VOL. 18, NO. 9, 959–972

90 : N Bessis, FJ GarciaCozar and M-C Boissier ; Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms ; *Gene Therapy* (2004) 11, S10–S17

91 : Grace Hampson, Adrian Towse, Steven D Pearson, William B Dreitlein, Chris Henshall ; Gene therapy: evidence, value and affordability in the US health care system ; *Journal of comparative effectiveness research* VOL. 7, NO. 1

92 : Renske M.T. ten Ham et Al. ; Challenges in Advanced Therapy Medicinal Product Development: A Survey among Companies in Europe ; *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* Vol. 11 December 2018

93 : Peter McArdle Executive Director, Regulatory Affairs - Cell & Gene Therapies ; ATMP Development Challenges: From Scientific Advice to Market Authorisation EMA-EuropaBio Information Day London, UK ; 15-Oct-2015

94 : Site internet d'Alnylam Pharmaceuticals : <https://www.alnylam.com/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

95 : Refusal of the marketing authorisation for Exondys (eteplirsén) ; Outcome of re-examination ; 21 September 2018 EMA/621972/2018 EMEA/H/C/004355

96 : Site de l'INSERM : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/myopathie-de-duchenne> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

97 : Site de l'EMA :

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza#authorisation-details-section> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

98 : Site de l'EMA

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tegsedi#authorisation-details-section> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

- 99 : Site de l'EMA <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/waylivra>
(*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 100 : Refusal of the marketing authorisation for Kynamro (mipomersen) ; 13 December 2012
EMA/792736/2012 EMEA/H/C/002429
- 101 : Site de l'Human Stem cells institute : <http://eng.hsci.ru/products/Neovasculgen>
(*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 102 : Etude du cabinet Deloitte : Next Generation Therapies and related Life Sciences topics
- 103 : Gene Therapy: Commercial Challenges and Strategic Choices ; Executive Insights ;
Volume XXI, Issue 38 <https://www.lek.com/sites/default/files/insights/pdf-attachments/2138-Gene-Therapy-Commercial-Challenges.pdf>
- 104 : Gene Therapy: A Paradigm Shift in Medicine ; Pharma Intelligence © 2018.
- 105 : Big Pharma Innovation in Small Places ; Jennifer Alsever May 13, 2016 ; Fortune.com ;
<https://fortune.com/2016/05/13/big-pharma-biotech-startups/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 106 : Site de Cell Culture DISH <https://cellculturedish.com/upstream-manufacturing-gene-therapy-viral-vectors/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 107 : Peter Jones ; Key engineering challenges in the biomanufacturing of lentiviral viral vectors ; Engineering Conferences International ECI Digital Archives ; 1-29-2019
- 108 : Pall Biotech : Upstream Bioprocessing for Manufacturing Viral Vectors
<https://biotech.pall.com/en/blog/upstream-processing-viral-vectors.html> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 109 : Kim, T.K. & Eberwine, J.H. Anal Bioanal Chem (2010) 397: 3173.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- 110 : Site de Downstream Column <https://downstreamcolumn.com/downstream-bioprocessing/downstream-manufacturing-gene-therapy-vectors/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)
- 111 : The National Institute for Innovation in Manufacturing Biopharmaceuticals ; Gene Therapy Roadmap

112 : Site de Uniqure : <http://www.uniqure.com/investors-newsroom/uniQure%20Corporate%20Overview%20060119.pdf> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

113 : Ruben Carbonell, Arpan Mukherjee, Jonathan Dordick, and Christopher J. Roberts ; A Technology Roadmap For Today's Gene Therapy Manufacturing Challenges ; Cell&Gene ; April 18, 2019

114 : Site internet de Spark Therapeutics <https://sparktx.com/scientific-platform-programs/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

115 : Site internet d'AveXis : <https://www.avexis.com/about> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

116 : BRANDY SARGENT ; Scale-Out Biomanufacturing – A Paradigm Change to Scale Up ; Cell Culture Dish ; JANUARY 24, 2018

117 : European Pharmaceutical review : <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/73939/strategy-for-the-adoption-of-single-use-technology/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

118 : WuXi Biologics : <https://www.wuxibiologics.com/scale-out-vs-scale-up-biomanufacturing/> (*Dernière consultation le 02/02/2020*)

119 : Moutsatsou, P., Ochs, J., Schmitt, R.H. et al. *Biotechnol Lett* (2019) 41: 1245. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02732-z>

120 : Etude Leem / AEC Partners : Cartographie de la Bioproduction en France ; 17 Janvier 2018

121 : 8^{ème} Conseil stratégique des industries de santé (CSIS) Hôtel de Matignon 10 juillet 2018

122 : Présentation Isabelle Sainte-Marie ; Chef de Pôle HémoVigilance, produits sanguins labiles, thérapie cellulaire, et produits radiopharmaceutiques. ^[1]ANSM- Direction ONCO-HEMATO ; Réglementation applicable aux Cellules Souches – Focus sur les ES (Cellules Souches Embryonnaires) ^[1]et iPS (Cellules Souches pluripotentes Induites) ; Journées ABM Paris 18-05-2017

123 : Avis sur la thérapie génique ; N°22 - 13 décembre 1990

124 : Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease?. Science. 1972;175(4025):949-955. doi:10.1126/science.175.4025.949

125 : Site de l'INSERM "Les grandes avancées - La thérapie génique devient enfin une réalité » : <https://histoire.inserm.fr/de-l-inh-a-l-inserm/50-ans-de-l-inserm/les-grandes-avancees/la-therapie-genique-devient-enfin-une-realite#:~:text=C'est%20l'ensemble%20de,des%20patients%20atteints%20de%20cancer.> (Dernière consultation le 13/09/2020)

126 : DIRECTIVE 2001/18/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil (Dernière consultation le 21/09/2020)

127 : Décret n° 2008-1273 du 5 décembre 2008 relatif au Haut Conseil des biotechnologies (Dernière consultation le 21/09/2020)

128 : Code de la santé publique : Section 2 : Autres recherches nécessitant une autorisation expresse portant sur les produits mentionnés aux articles L. 1125-1 à L. 1125-3. (Articles R1125-7 à R1125-13) (Dernière consultation le 21/09/2020)

129 : Site de l'ANSM : <https://www.ansm.sante.fr/afssaps/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/L-ANSM-met-en-place-un-dispositif-accelere-d-autorisation-d-essais-cliniques-Fast-Track-Point-d-Information#:~:text=Afin%20de%20permettre%20un%20acc%C3%A8s,de%20la%20s%C3%A9curit%C3%A9%20des%20patients.> (Dernière consultation le 21/09/2020)

130 : Site de l'ANSM : [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Dispositif-accelere-d-autorisation-d-essais-cliniques-Fast-Track/\(offset\)/11](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Dispositif-accelere-d-autorisation-d-essais-cliniques-Fast-Track/(offset)/11) (Dernière consultation le 21/09/2020)

131 : EMA : Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. 22 March 2018 EMA/CAT/80183/2014 Committee for Advanced Therapies (CAT) (Dernière consultation le 21/09/2020)

132 : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2912140/fr/onpattro (Dernière consultation le 05/10/2020)

133 : https://www.has-sante.fr/jcms/p_3191915/fr/givlaari (Dernière consultation le 05/10/2020)

134 : <http://eng.hsci.ru/products/neovasculgen> (Dernière consultation le 05/10/2020)

135 : <https://www.imlygic.com/> (Dernière consultation le 05/10/2020)

136 : <http://www.genetherapynet.com/gendicine.html> (Dernière consultation le 05/10/2020)

137 : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2964759/fr/luxturna (Dernière consultation le 05/10/2020)

138 : <https://www.genetherapynet.com/oncorine.html> (Dernière consultation le 05/10/2020)

139 : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2579395/fr/glybera-alipogene-tiparvovec-therapie-genique (Dernière consultation le 05/10/2020)

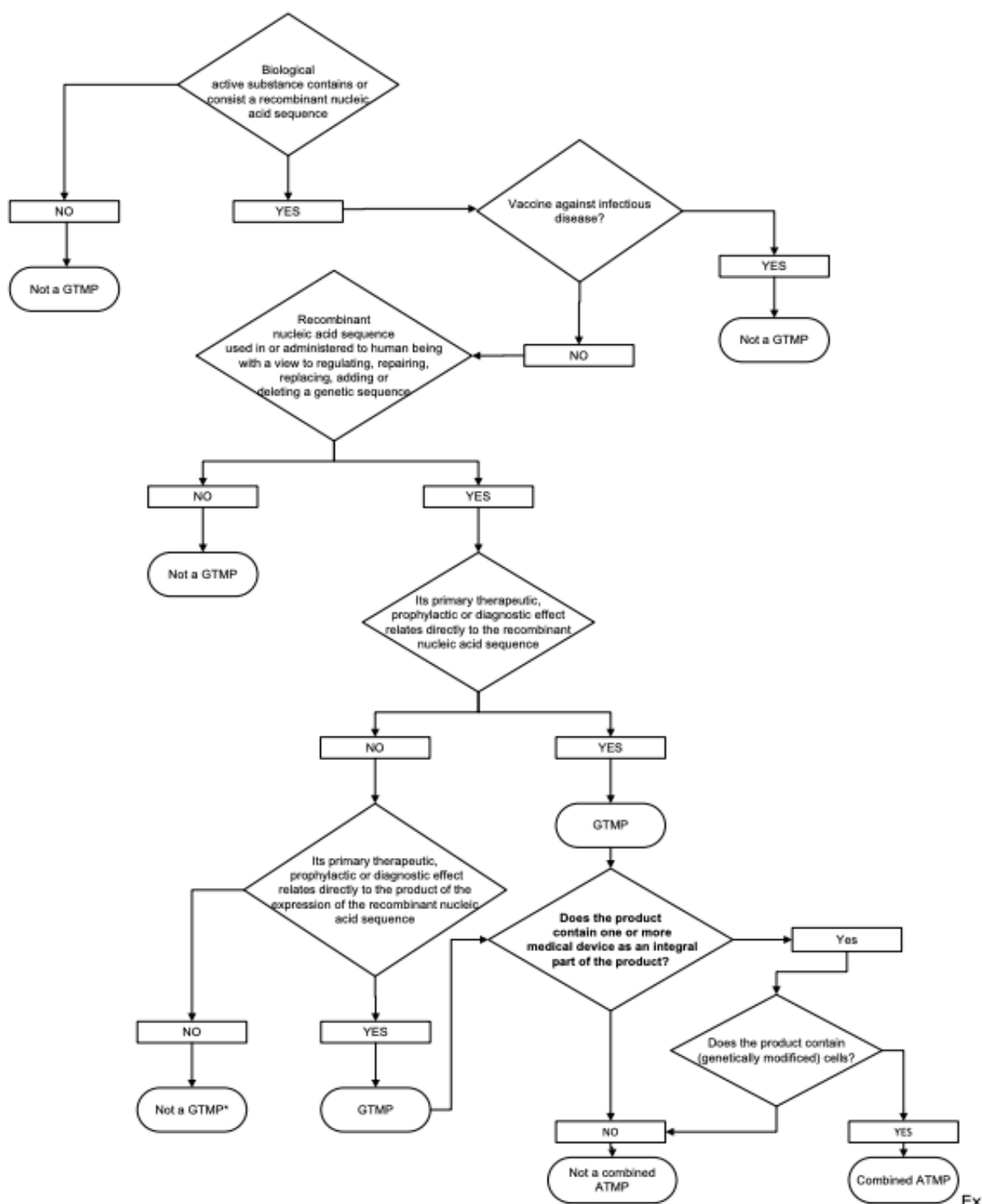
140 : https://www.huffingtonpost.fr/entry/prix-nobel-crispr-cas9-la-revolution-genetique-qui-promet-le-meilleur-et-le-pire_fr_5f7d95a6c5b61229a059e37f (Dernière consultation le 17/10/2020)

141 : <https://www.gensight-biologics.com/> (Dernière consultation le 22/10/2020)

VII – Annexes

Annexe 1 : Arbre de caractérisation des produits de thérapies géniques

21 May 2015 EMA/CAT/600280/2010 rev.1 Committee for Advanced Therapies Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products



Annexe 2 : Calendrier standard pour l'évaluation d'un Médicament de Thérapie Innovante pour l'autorisation de mise sur le marché initiale dans le cadre d'une procédure centralisée

Day/ Milestones	Action	Responsibilities
Day 1. Start Date	Start of the procedure In the case of an ATMP containing or consisting of GMOs, the EMA will inform the GMO competent authorities of the start of the procedure and manages the coordination with the GMO competent authorities. In the case of advanced therapy medicinal products which incorporate medical devices or active implantable medical devices, ("combined ATMPs"), the EMA manages the coordination of the consultation with the Notified Body at the relevant time points of the procedure.	EMA
Day 80. CAT (Co-) Rapporteur ARs	The CAT Rapporteur and Co-Rapporteur each send their Assessment Report(s) to the CAT, CHMP Coordinators, and CHMP members and EMA. The CAT Rapporteur will focus his evaluation of the RMP on the safety specifications and the need for long-term efficacy follow-up. EMA sends the Day 80 Assessment Reports to the applicant making it clear that it only sets out their preliminary conclusions and that it is sent for information only and does not yet represent the position of the CAT.	CAT (Co-) Rapporteurs
Day 94. PRAC Rapporteur AR	PRAC Rapporteur circulates the RMP assessment report, focusing on the prospective planning aspects: pharmacovigilance plan and risk minimisation measures, and proposed RMP LoQ to CAT (Co-) Rapporteurs, CHMP Coordinators, other CAT, PRAC and CHMP Committee members and EMA. EMA sends the PRAC Rapporteur AR to the applicant for information.	PRAC Rapporteur
Day 100. CAT, CHMP and PRAC comments	CAT (Co-)Rapporteurs, CHMP Coordinators, other CAT, PRAC and CHMP Committee members (including peer reviewers) and EMA send comments.	CAT(Co-)Rapporteurs, CHMP Coordinators, CHMP, PRAC and CAT members
Day 101-104.	PRAC adopts PRAC RMP Assessment Overview and Advice for D120 LoQ.	PRAC
Day 106.	PRAC Rapporteur circulates the updated RMP AR and list of	PRAC

PRAC Rap AR	questions (PhV & RMin activities only) based on the Committee members' comments for D120 LoQ.	
Day 114. CAT List of Questions (Called "Day 120 LoQ")	<p>CAT adopts the Day 120 list of questions as well as the overall conclusions and review of the scientific data to be sent to the applicant by the EMA.</p> <p>At the latest by Day 114, the CAT adopts a request for GMP/GLP/GCP inspection, if necessary (Inspection procedure starts).</p> <p>The major objections and key scientific issues (from the LoQ) are presented to the CHMP.</p> <p>In the exceptional case that the CHMP identifies major issues with the Day 120 LoQ (e.g. identification of <i>de novo</i> important scientific questions), these will be added to the LoQ in collaboration with the CAT Chair and the CAT(Co-)Rapporteurs. The updated LoQ will be circulated to the CAT for information and sent to the applicant.</p>	<p>CAT</p> <p>CHMP Coordinators & CAT(Co-)Rapporteurs</p> <p>CHMP</p>
Clock Stop	<p>Reference is made to the CHMP Document "Time allowed for applicants to respond to questions and issues raised during the assessment of new marketing authorisation applications in the centralised procedure".</p> <p>On justified grounds, the CAT may agree to a longer clock-stop. The CHMP is informed about the clock stop.</p>	Applicant
Day 115. Restart	Submission of the responses, including revised summary of product characteristics labelling and package leaflet texts in English, and restart of the clock.	Applicant
Day 150. CAT Rapporteurs Joint AR (JAR)	<p>CAT (Co-)Rapporteurs send the Joint Response Assessment Report to CHMP Coordinators, PRAC, CAT and CHMP members and the EMA.</p> <p>There is no standalone PRAC Rapporteur AR on the RMP circulated at this stage.</p> <p>EMA sends this joint Assessment Report to the applicant making clear that it is sent for information only and does not yet represent the position of the CAT.</p> <p>Where applicable inspection to be carried out.</p> <p>EMA/QRD sub-group meeting for the review of English product Information with participation of the applicant (optional) around day 165.</p>	CAT (Co-) Rapporteurs
Day 160. PRAC comments	Comments from PRAC on Joint CAT AR	PRAC members
Day 164. CAT and CHMP comments	Comments from CAT and CHMP on Joint CAT AR	CAT and CHMP members

Day 166. Updated PRAC Rap AR	The PRAC Rapporteur presents the assessment on the prospective planning aspects of the RMP and the members' comments received at the PRAC plenary. The PRAC Rapporteur will then liaise with the CAT (Co)-Rapporteurs to reflect the members' comments and the PRAC plenary discussion in the joint Assessment Report. PRAC adopts PRAC RMP Assessment Overview and Advice for D180 LoOI.	PRAC Rapporteur
Day 170. Updated CAT JAR	Updated CAT Joint AR	CAT (Co-) Rapporteurs
Day 174. CAT List of outstanding issues/draft opinion (Called "Day 180 LoOI")	CAT discussion and decision on the need for an adoption of a list of "outstanding issues" (LoOI) and/or an oral explanation by the applicant or CAT draft opinion. CAT adopts the LoOI as well as the overall conclusions and review of the scientific data to be sent to the Applicant by the EMA. Clock stop. The major objections and key scientific issues from the LoOI are presented to the CHMP. In the exceptional case that the CHMP identifies major issues with the Day 180 LoOI (e.g. identification of <i>de novo</i> important scientific questions), these will be added to the LoOI in collaboration with the CAT Chair and the CAT Rapporteurs. The updated LoOI will be circulated to the CAT for information and sent to the applicant. Submission of final inspection report to EMA, CAT (Co-) Rapporteurs, CHMP Coordinators by the inspections team (at the latest by day 174.). If there is no LoOI or oral explanation, the CAT can adopt the draft opinion and transmit it to the CHMP.	CAT CHMP Coordinators & CAT(Co-)Rapporteurs CHMP
Clock Stop	Reference is made to the CHMP Document "Time allowed for applicants to respond to questions and issues raised during the assessment of new marketing authorisation applications in the centralised procedure". On justified grounds, the CAT may agree to grant a longer clock-stop. The CHMP is informed about the clock stop.	Applicant
Day 175. Restart	Restart of the clock with submission of responses or oral explanation (if needed).	Applicant
Day 189. CAT JAR	The CAT(Co)-Rapporteurs draft a joint assessment report (including the RMP aspects), taking into account the input from CHMP Coordinators/PRAC Rapporteurs and the applicant's responses A PRAC discussion is not foreseen at this stage.	CAT (Co-) Rapporteurs

Day 195. CAT, CHMP, PRAC and EMA comments	CAT, CHMP and PRAC Committee members and EMA send comments on the assessment report.	CAT, CHMP, PRAC and EMA
Day 200. Updated CAT JAR	The updated AR is circulated to the PRAC and CHMP Committee members and EMA.	CAT (Co-) Rapporteurs
Day 204. CAT opinion	CAT adopts the draft opinion and draft Assessment Report and transmits it to the CHMP.	CAT
By Day 210. CHMP opinion	Adoption of CHMP Opinion and CHMP Assessment Report (and timetable for the provision of product information translations) ¹	CHMP

Day	Action	Responsibilities
215 at the latest	Applicant provides to the EMA the product information and Annex A in the 25 languages (EU official languages and Icelandic and Norwegian) and the "QRD Form 1" by Eudralink*	Applicant
229	Member States will send linguistic comments on the product information by e-mail to the applicant with a copy to the EMA product shared mailbox together with QRD Form 1	Member States
235 at the latest	Applicant provides EMA with final translations of summary of product characteristics, Annex II, labeling and package leaflet in the 25 languages (+ "QRD Form 2" and "PDF checklist") by Eudralink.	Applicant
237	Transmission of Opinion and Annexes in all EU languages to applicant, Commission and Norway and Iceland.	EMA
239-261	The Commission adopts a draft Decision and consults the Standing Committee	European Commission
By 277	Finalisation of EPAR in consultation with Rapporteur, Co-Rapporteur, CAT, CHMP and Applicant (the latter for confidentiality aspects)	EMA
277	Commission adopts a decision	European Commission

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.