



**HAL**  
open science

# Les enjeux de la production industrielle des médicaments de thérapie génique : cas des vecteurs viraux rAAV

Mathilde Piquenot

## ► To cite this version:

Mathilde Piquenot. Les enjeux de la production industrielle des médicaments de thérapie génique : cas des vecteurs viraux rAAV. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03292601

**HAL Id: dumas-03292601**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03292601>**

Submitted on 20 Jul 2021

**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.

**UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE**  
**UFR SANTE – Département PHARMACIE**

Année 2021

N°

**THESE**

**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 21/05/2021

par

*Piquenot Mathilde*

Née le 23/03/1994 à Bernay

***Les enjeux de la production industrielle des  
médicaments de thérapie génique :  
cas des vecteurs viraux rAAV***

Président du jury : ***Mr Vérité Philippe***, professeur des Universités,  
*Université de Rouen*

Membres du jury : ***Mr Martinet Jérémie***, maître de conférences  
*universitaire – Praticien hospitalier, Université de  
Rouen*

***Mr El Gueddari Morad***, pharmacien/ingénieur –  
*Directeur production, Yposkesi*



**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »**

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021**

**U.F.R. SANTÉ DE ROUEN**

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**  
**Professeur Agnès LIARD**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

**I - MEDECINE**

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc <b>BASTE</b>	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie

Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CHB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CHB	Radiothérapie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mme Julie <b>GUEUDRY</b>	HCN	Ophtalmologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude <b>HOUDAYER</b>	HCN	Génétique
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HCN	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian <b>SCHWARZ</b>	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>surnombre</i> )	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HC	Rhumatologie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>	HCN	Nutrition
Mme Elodie <b>ALESSANDRI-GRADT</b>	HCN	Virologie
Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
M. Vianney <b>GILARD</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent <b>MARGUET</b>	HCN	Histologie
Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>	HCN	Gastroentérologie
M. Sébastien <b>MIRANDA</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	UFR	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
M. Abdellah <b>TEBANI</b>	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr Julien <b>WILS</b>	HCN	Pharmacologie

## PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## ATTACHE TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE à MI-TEMPS

Mme Justine <b>SAULNIER</b>	UFR	Biologie
-----------------------------	-----	----------



## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Thomas <b>CASTANHEIRO MATIAS</b>	Chimie Organique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Chervin <b>HASSEL</b>	Virologie

Mme Maryline <b>LECOINTRE</b>	Physiologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
M. Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mme Caroline <b>BERTOUX</b>	Pharmacie

#### **PAU-PH**

M. Mikael **DAOUPHARS**

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

#### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Mme Alice <b>MOISAN</b>	Virologie
M. Henri <b>GONDÉ</b>	Pharmacie

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mme Soukaina <b>GUAOUA-ELJADDI</b>	Informatique
Mme Clémence <b>MEAUSSONE</b>	Toxicologie

#### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT**

Mme Ramla <b>SALHI</b>	Pharmacognosie
------------------------	----------------

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mme Elsa **FAGOT-GRIFFIN** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905) Mme
Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)	Physiologie
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm
1076) Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage,
orthophonie	
Mme Anne-Sophie <b>PEZZINO</b>	Orthophonie
Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var <b>TAN</b>	Immunologie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)	Biochimie (UMR 1079)

**DIRECTEUR ADMINISTRATIF** : M. Jean-Sébastien **VALET**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du*

*Rouvray CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen*

# Table des matières

<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>2</b>
<b>Table des abréviations</b> .....	<b>4</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>I. Les médicaments de thérapie génique</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Le gène médicament</b> .....	<b>9</b>
1.1. Origine des maladies génétiques.....	9
1.1.1. Histoire de la génétique.....	9
1.1.2. L'ADN, origine des maladies génétiques .....	10
1.1.3. Modes de transmission des maladies génétiques.....	12
1.2. Les progrès de la génétique médicale .....	13
1.3. Objectifs thérapeutiques.....	15
1.4. Concept du médicament de thérapie génique.....	17
1.5. Stratégies in vivo et ex vivo .....	18
<b>2. Les outils du transfert de gène</b> .....	<b>20</b>
2.1. Paramètres d'efficacité pour le choix du vecteur .....	20
2.2. Vecteurs viraux.....	22
2.2.1. Principe d'utilisation de virus modifiés comme vecteurs .....	22
2.2.2. Paramètres de sécurité liés aux vecteurs viraux.....	23
2.2.3. Vecteurs rétroviraux.....	24
2.2.4. Vecteurs adénoviraux.....	25
2.2.5. Virus adéno-associés .....	26
2.3. Vecteurs synthétiques.....	29
2.3.1. Lipides cationiques.....	29
2.3.2. Polymères cationiques.....	31
2.3.3. Dendrimères .....	32
2.4. Méthodes physiques .....	33
2.4.1. Micro-injection.....	33
2.4.2. Biolistique .....	33
2.4.3. Electroporation.....	34
2.5. Outils d'édition du génome .....	35
2.5.1. Zinc Finger Nucleases.....	36
2.5.2. TALENs.....	36
2.5.3. CRISPR/Cas9.....	38
2.5.4. Transposon « sleeping beauty ».....	40
<b>3. Etat des lieux : des premiers essais cliniques à la mise sur le marché de médicaments de thérapie génique</b> .....	<b>42</b>
3.1. Les débuts de la thérapie génique.....	42
3.2. Les complications potentielles et stratégies pour minimiser ces risques.....	43
3.3. Les essais cliniques .....	44
3.4. Les médicaments sur le marché.....	47

<b>II. Cadre réglementaire de la production des médicaments de thérapie génique</b>	<b>51</b>
1. Définition réglementaire du médicament de thérapie génique .....	51
1.1. Médicament biologique .....	51
1.2. Médicament de biotechnologie .....	51
1.3. Médicament de thérapie innovante.....	52
1.4. Médicament de thérapie génique.....	52
2. Textes réglementaires opposables.....	56
2.1. Règlementation OGM.....	56
2.1.1. Demande d'agrément OGM .....	56
2.1.2. Evaluation des risques et mesures de confinement .....	58
2.2. Bonnes pratiques de fabrication.....	60
2.2.1. Production en conditions aseptiques .....	60
2.2.2. Matières premières et matières de départ .....	65
2.3. Pharmacopée Européenne .....	66
3. Guidelines & aides au développement.....	67
3.1. Guidelines ICH.....	67
3.2. Guidelines CAT .....	69
<b>III. Les enjeux de la production industrielle des vecteurs viraux.....</b>	<b>72</b>
<b><u>Partie A : le procédé de production de vecteurs viraux recombinants rAAV.....</u></b>	<b>72</b>
1. Introduction.....	72
2. Stratégies de production des vecteurs viraux recombinants .....	73
2.1. Transfection transitoire d'ADN plasmidique .....	73
2.1.1. Systèmes de production utilisant des virus (transfection et infection) .....	73
2.1.2. Systèmes de production sans virus (transfection).....	74
2.2. Utilisation de lignées cellulaires d'empaquetage ou lignées cellulaires productrices	75
2.2.1. Lignée cellulaire d'empaquetage .....	75
2.2.2. Lignée cellulaire productrice .....	75
2.3. Système d'expression baculoviral.....	76
3. Des matériels de départ biologiques complexes.....	78
3.1. Banques de cellules.....	78
3.1.1. Définition .....	78
3.1.2. Principe des banques cellulaires .....	78
3.1.3. Caractérisation et contrôle des banques cellulaires.....	80
3.1.4. Principales lignées cellulaires utilisées pour la production de rAAV .....	82
3.2. Banques de plasmides ADN .....	82
3.2.1. Principe de production et de contrôle des plasmides.....	83
4. Etapes de culture cellulaire et production des rAAV ( <i>upstream</i> ) .....	84
4.1. Culture de cellules adhérentes .....	84
4.2. Culture de cellules en suspension .....	85
4.3. Tri-transfection des cellules amplifiées.....	86
5. Etapes de purification des rAAV ( <i>downstream</i> ).....	87
5.1. Introduction .....	87
5.2. Récolte des cellules, lyse cellulaire et benzonase .....	88
5.3. Etapes de chromatographie.....	88
5.3.1. Chromatographie d'affinité.....	88
5.3.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	89
5.4. Ultrafiltration (concentration) & diafiltration.....	90
6. Remplissage et finition .....	91

6.1.	Répartition aseptique.....	91
6.2.	Mirage.....	93
<b><u>Partie B : les enjeux de la production industrielle des vecteurs viraux rAAV</u></b> .....		<b>94</b>
<b>1.</b>	<b>Enjeux « sécurité »</b> .....	<b>94</b>
1.1.	Des procédés sans matière d'origine animale.....	94
1.2.	Des agents de lyse cellulaire plus écologiques .....	95
1.3.	Des lignées cellulaires plus sûres.....	96
<b>2.</b>	<b>Enjeux « efficacité »</b> .....	<b>96</b>
2.1.	Amélioration de l'efficacité de l'étape de transfection .....	97
2.2.	Enrichissement du produit en capsides pleines .....	98
2.2.1.	Etape de chromatographie échangeuse d'ions .....	98
2.2.2.	Modification de la méthode de transfection : exemple du système TESSA.....	99
<b>3.</b>	<b>Enjeux « coûté/qualité »</b> .....	<b>100</b>
3.1.	Augmenter l'échelle : vers un procédé en suspension.....	101
3.2.	Standardiser les étapes : vers une plateforme de production.....	102
3.2.1.	Standardisation des étapes upstream .....	103
3.2.2.	Standardisation des étapes downstream.....	106
3.3.	Accélérer l'augmentation des capacités de production .....	108
<b>Conclusion</b> .....		<b>110</b>
<b>Annexes</b> .....		<b>111</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....		<b>114</b>



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de maladies génétiques selon leur mode de transmission.....	12
Tableau 2 : Principales caractéristiques des vecteurs viraux.....	28
Tableau 3 : Caractéristiques principales des outils d'édition génomique utilisant des nucléases .....	40
Tableau 4 : Caractéristiques des médicaments de thérapie génique sur le marché européen (EMA) et américain (FDA) (liste mise à jour en mars 2021).....	49
Tableau 5 : Principaux textes réglementaires applicables aux médicaments de thérapie génique en Europe.....	55
Tableau 6 : Description des 4 classes de confinement OGM .....	57
Tableau 7 : Correspondance entre les groupes d'OGM et les classes de confinement .....	58
Tableau 8 : Principaux chapitres de la Pharmacopée Européenne concernant les médicaments de thérapie génique.....	67
Tableau 9 : Principales guidelines ICH applicables aux médicaments de thérapie génique .....	69
Tableau 10 : Recommandations liées au développement de médicaments biologiques (liste non exhaustive).....	70
Tableau 11 : Recommandations européennes spécifiques au développement de médicaments de thérapie génique.....	71
Tableau 12 : Extrait de la monographie 5.2.3 de la pharmacopée européenne.....	81
Tableau 13 : Avantages et inconvénients des différentes stratégies de production des rAAV....	105

## Liste des annexes

**Annexe I** : Annexe III.2 du Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés (« Description des confinements pour l'utilisation d'OGM en milieu industriel »)

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant le support de l'information génétique .....	10
Figure 2 : Mécanisme de l'expression des gènes.....	11
Figure 3 : Evolution du coût de séquençage d'un génome humain.....	13
Figure 4 : Evolution et perspectives de la prise en charge des maladies génétiques .....	15
Figure 5 : Stratégies de "gene augmentation" et de "gene suppression" .....	16
Figure 6 : Physiopathologie simplifiée de l'amylose héréditaire à transthyrétine et mécanisme d'action du médicament Onpattro .....	17
Figure 7 : Les deux voies de la thérapie génique .....	18
Figure 8 : Principe des vecteurs intégratifs et non-intégratifs.....	21
Figure 9 : Structure générale d'un virus.....	22
Figure 10 : Cycle viral d'un rétrovirus.....	25
Figure 11 : Cycle viral d'un AAV.....	26
Figure 12 : Génome viral d'un AAV sauvage et d'un AAV recombinant .....	27
Figure 13 : Sérotypes d'AAV les plus couramment utilisés pour le transfert de gènes et leurs tropismes préférentiels respectifs .....	28
Figure 14 : Structure des lipides cationiques .....	29
Figure 15 : Principaux lipides cationiques utilisés pour le transfert de gènes.....	30
Figure 16 : Mécanisme d'entrée du lipoplexe dans la cellule .....	30
Figure 17 : Structure des principaux polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène...	31
Figure 18 : Structure d'un lipopolyplexe.....	32
Figure 19 : Structure d'un dendrimère .....	32
Figure 20 : Mécanisme d'action du gene gun .....	34
Figure 21 : Mécanisme d'électroporation.....	34
Figure 22 : Principe de l'édition génomique.....	35
Figure 23 : Structure schématique d'une paire de Zinc Finger Nucleases .....	36
Figure 24 : Structure d'une TALEN unitaire et d'une paire de TALENs .....	37
Figure 25 : Procédé de production des UCAR T-cells Collectis .....	38
Figure 26 : Structure du système CRISPR/Cas9 et mécanismes de réparation associés .....	39
Figure 27 : Mécanisme d'action du transposon "sleeping beauty" .....	41
Figure 28 : Le Professeur Alain Fischer (Unité Inserm 768 "Développement normal et pathologique du système immunitaire") portant un bébé-bulle.....	42
Figure 29 : Nombre d'essais cliniques de thérapie génique par an au niveau international (2000- 2018).....	44

Figure 30 : Distribution géographique, indications et phases des essais cliniques de thérapie génique en cours.....	45
Figure 31 : Répartition des vecteurs utilisés en essais cliniques et types de transgènes .....	46
Figure 32 : Principe de la tri-transfection.....	74
Figure 33 : Principe des lignées cellulaires d’empaquetage et des lignées cellulaires productrices .....	76
Figure 34 : Principe de production de protéines recombinantes par un système baculoviral.....	77
Figure 35 : Principe de fonctionnement d’un système de banque cellulaire .....	79
Figure 36 : Principe de production des plasmides.....	83
Figure 37 : Procédé de production de vecteurs viraux recombinants.....	84
Figure 38 : Flacons de culture de cellules adhérentes.....	85
Figure 39 : A gauche un bioréacteur STR, à droite un bioréacteur RM (rock motion) ou « wave bioreactor ».....	86
Figure 40 : Comparaison entre une IgG humaine et un anticorps de camélidé. ....	89
Figure 41 : Principe de purification des rAAV par la résine POROS™ .....	89
Figure 42 : Principe de la filtration tangentielle des rAAV .....	90
Figure 43 : Photos de semi-automates de répartition .....	92
Figure 44 : Principe du fonctionnement de la technologie Crystal® closed vials.....	93
Figure 45 : Structure du Triton X-100.....	95
Figure 46 : Comparaison de la formation de capsides vides : transfection VS infection.....	99
Figure 47 : Répartition des coûts de production pour un procédé suspension à l'échelle 1000L .....	100
Figure 48 : A gauche, un Hyperstack à 36 étages ; à droite, le bioréacteur iCELLis®.....	101
Figure 49 : Comparaison des procédés adhérent et suspension (scale-out VS scale-up).....	102
Figure 50 : Les différents grades de plasmides .....	104
Figure 51 : Principe de fonctionnement de la plateforme Elevecta®.....	105
Figure 52 : Evolution du rendement en fonction du nombre d’étapes.....	106
Figure 53 : Simplification du processus de purification des rAAV grâce au développement de résines d’affinité performantes .....	107
Figure 54 : Flux de diffusion à travers une résine poreuse (à gauche) et une matrice Fibro (à droite) .....	108
Figure 55 : Un module KUBio™ .....	108
Figure 56 : Systèmes de production proposés dans le service de Flex Factory Cytiva .....	109
Figure 57 : Plusieurs modules KUBio™.....	109

## Table des abréviations

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
AAVS1	<i>Adeno-Associated Virus integration Site 1</i>
ADA	<i>Adenosine Deaminase Defficiency</i>
ADNc	ADN complémentaire
ATMP	<i>Advanced Therapy Medicinal Products</i>
ANSM	Agence Nationale de Sécurité des Médicaments
AAP	<i>Assembly-Activating Protein</i>
BSL	<i>Biological Safety Level</i>
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i>
CTA	Centrale de Traitement d'Air
CAR (récepteur)	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CAR (protéine)	<i>Coxsackievirus and Adenovirus Receptor</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>
CAT	<i>Comittee for Advanced Therapies</i>
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
COMP	<i>Committee for Orphan Medicinal Products</i>
CCS	<i>Contamination Control Strategy</i>
CDMO	<i>Contract Development and Manufacturing Organization</i>
CMO	<i>Contract Manufacturing Organization</i>
CQ	Contrôle Qualité
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
DSVA	Désinfection des Surfaces par Voie Aérienne
DSP	<i>DownStream Process</i>
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GTMP	<i>Gene Therapy Medicinal Product</i>

GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HCB	Haut Conseil des Biotechnologies
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
IU	<i>Infectious Unit</i>
<i>Indel</i>	Insertion-Délétion
ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement
ICH	<i>International Council for Harmonization</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
LD	Ligne Directrice
LDGCB	Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
LMPGCB	Lymphome Médiastinal Primitif à Grandes Cellules B
MCB	<i>Master Cell Bank</i>
MTG	Médicament de Thérapie Génique
MTI	Médicaments de Thérapies Innovantes
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
p.I	point isoélectrique
PLL	Poly-L-lysine
PAMAM	Polyamidoamine
PEI	Polyéthylèneimine
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PRIME	<i>Priority Medicines</i>
PAM	<i>Protospacer-Associated Motif</i>
R&D	Recherche et Développement
rAAV	<i>Recombinant Adeno-Associated Virus</i>
RMAT	<i>Regenerative Medicine Advanced Therapy</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals</i>
rcAAV	<i>replication competent AAV</i>
RCV	<i>Replication Competent Viruses</i>
RM	<i>Rock Motion</i>
SIN	<i>Self-Inactivating</i>

SVF	Sérum de Veau Fœtal
SMR	Service Médical Rendu
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
STR	<i>Stirred-Tank Reactor</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TFF	<i>Tangential Flow Filtration</i>
TESSA	<i>Tetracycline Enabled Self Silencing Adenovirus</i>
TALE	<i>Transcription Activator-Like Effector</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
TSE	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathy</i>
USP	<i>Upstream Process</i>
VG	<i>Vector Genome</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WCB	<i>Working Cell Bank</i>
SCID-X	<i>X-linked Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nuclease</i>
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée

## Introduction

On recense à l'heure actuelle plus de 8000 maladies génétiques, parmi lesquelles certaines sont des affections bénignes alors que d'autres sont extrêmement graves et handicapantes. Toutes les maladies génétiques s'expliquent par la présence d'une anomalie au niveau d'un gène ou d'un chromosome. La plupart de ces maladies sont rares et difficiles à diagnostiquer, et bien souvent la seule option thérapeutique consiste en un traitement symptomatique palliatif. En effet, la seule façon de guérir durablement une maladie génétique est de corriger le gène défectueux du patient.

La mise à disposition des premières cartes génétiques humaines dans les années 1990 et les milliards de dollars dépensés pour séquencer le premier génome humain ont permis des progrès considérables dans le domaine scientifique, et notamment dans la compréhension des maladies génétiques. Ainsi, les gènes responsables de plus de 3500 maladies génétiques ont été identifiés, marquant un pas décisif vers le développement de médicaments de « thérapies innovantes » dont font partie les médicaments de thérapie génique. Si différentes approches peuvent être envisagées, dans la plupart des cas le traitement consiste à administrer au patient la copie normale du gène présentant la mutation à l'origine de la maladie.

Bien que le concept de thérapie génique date des années 1950, les premiers essais cliniques ont vu le jour dans les années 1990 chez des enfants atteints de déficits immunitaires. Par la suite, les efforts de la recherche et des industriels ont conduit à la mise sur le marché du premier médicament de thérapie génique en Europe en 2012 (Glybera®) ; et le domaine connaît depuis un essor considérable, avec plus de 700 essais cliniques en cours au niveau international en 2021. Parallèlement au développement de ces médicaments, un cadre réglementaire a été mis en place, d'une part pour aider et guider les entreprises développant ces médicaments innovants, et d'autre part pour assurer la sécurité des patients. Ce cadre continue à évoluer avec l'acquisition des connaissances et du recul sur ces médicaments.

Pour exercer son action thérapeutique, le gène sain doit atteindre les cellules du patient. Dans ce but, une des stratégies est de détourner les propriétés d'infection des virus afin de vectoriser le « gène médicament ». Ce dernier va donc être enveloppé dans une structure de virus, capable d'entrer dans les cellules du patient. De par leur nature, les vecteurs viraux de thérapie génique sont donc complexes à fabriquer, et leur procédé de production est encore peu standardisé et très coûteux ; il peut en effet atteindre plusieurs centaines de milliers d'euros par patient. Or, au vu du nombre croissant d'essais cliniques mettant en jeu des vecteurs viraux, il est nécessaire de pouvoir produire en quantité suffisante et à des coûts acceptables.

Dans la première partie de cette thèse seront décrits les médicaments de thérapie génique, et en particulier les vecteurs viraux, ainsi qu'un état des lieux sur les essais cliniques et les médicaments de thérapie génique sur le marché. Dans un second temps, un aperçu du cadre

règlementaire permettra de définir les médicaments de thérapie génique et de comprendre les principales contraintes de développement et de fabrication qui y sont associées. Enfin, le procédé de production des vecteurs viraux sera déroulé et les principaux enjeux et problématiques auxquels les industriels doivent faire face seront exposés.



# I. Les médicaments de thérapie génique

## 1. Le gène médicament

### 1.1. Origine des maladies génétiques

Il existe plus de 8000 maladies génétiques à travers le monde, souvent graves, difficiles à diagnostiquer et à soigner<sup>(1)</sup>. La plupart des maladies génétiques sont des pathologies rares (environ 80%), touchant un nombre restreint de personnes (1 personne sur 2000 en Europe, soit moins de 30 000 malades par pathologie), et sont classées comme maladies orphelines : les personnes atteintes ne bénéficient pas de traitement spécifique<sup>(2)</sup>. Les maladies génétiques concernent environ 3 millions de personnes en France, et 35 millions en Europe. Si certaines maladies génétiques entraînent l'apparition de symptômes dès la naissance ou l'enfance, d'autres ne se manifestent qu'après plusieurs dizaines d'années. Elles peuvent toucher tout type de système (neurologique, musculaire, vision...) ou organe (foie, poumons...) mais sont toutes causées par une anomalie au niveau d'un gène ou d'un chromosome. Les progrès de la génétique ont permis de mettre en évidence ces anomalies.

#### 1.1.1. Histoire de la génétique

La génétique est l'étude de la transmission de caractères héréditaires et des gènes, qui sont le support de l'information génétique. La mise en évidence de la transmission de caractères héréditaires date du XVII<sup>ème</sup> siècle. Dans la seconde moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle, les bases de la génétique moderne sont posées par le moine Johann Gregor Mendel, suite à des expériences menées sur le croisement de petits pois<sup>(3)</sup>. Les lois de Mendel décrivent la transmission de certains traits héréditaires ainsi que la notion d'allèles, qui correspondent à différentes versions d'un même gène, et qui peuvent être dominants ou récessifs. Cependant, ces lois sont ignorées jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle.

En 1913, les premières « cartes génétiques » identifiant les différents gènes de la drosophile sont établies par Morgan et Sturtevent<sup>(3)</sup> ; ces travaux vaudront à Morgan le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1933. En 1944, Avery, MacLeod et McCarty prouvent, grâce à des expériences menées sur des bactéries, que l'information génétique est portée par l'acide désoxyribonucléique (ADN)<sup>(3)</sup>. Sa structure en double hélice est mise en évidence en 1953 par Watson, Crick et Franklin, et cette découverte est saluée par l'obtention du prix Nobel de médecine en 1962. Les années 1970 voient ensuite se dessiner la compréhension du code génétique, de l'information génétique portée par l'ADN jusqu'à la production de protéines, ainsi que la découverte des enzymes de restriction,

capables de cliver l'ADN au niveau de sites précis. C'est à cette même période qu'ont eu lieu les premières expériences de clonage et de transfert de gènes chez la bactérie *Escherichia coli*.

Suite à ces découvertes et au développement de la biologie « à grande échelle » qui s'appuie sur l'aide de robots et d'automates, les premières cartes du génome humain ont été publiées par le laboratoire Généthon dans les années 1990<sup>(3)</sup>. Les informations contenues dans ces cartes ont permis des avancées considérables dans la compréhension des maladies génétiques et ont bouleversé le monde de la recherche académique et industriel.

### 1.1.2. L'ADN, origine des maladies génétiques

Le corps humain est constitué de milliards de cellules, comportant chacune un noyau qui renferme l'information génétique d'un individu. Dans le noyau, celle-ci est répartie sur 46 chromosomes organisés en 23 paires (Figure 1). Les chromosomes sont constitués d'ADN, porteur de nos gènes : ils forment notre patrimoine génétique, unique à chacun et transmis par nos parents. L'ensemble de cette information génétique, appelée génome, est constitué de parties codantes, les exons, et de parties non-codantes appelées introns<sup>(1)</sup>. Les parties codantes correspondent aux gènes, contenant l'information nécessaire pour produire des protéines, qui permettent le fonctionnement normal du corps humain. Le génome humain comporte environ 25 000 gènes. Les parties non-codantes quant à elles, ne portent pas d'information utile pour la production de protéines et représentent 98% du génome humain.

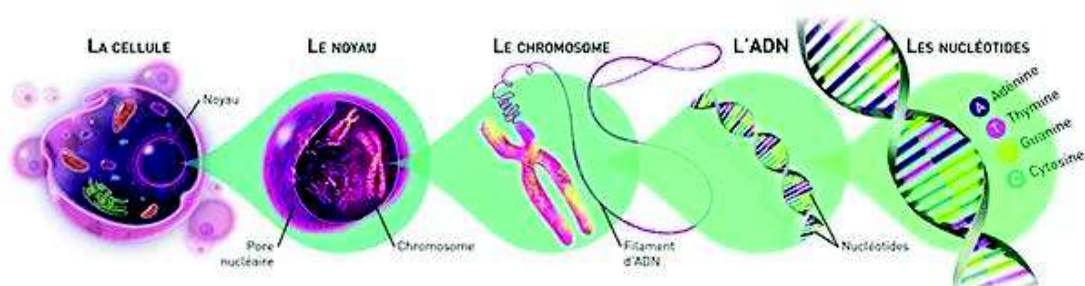


Figure 1 : Schéma représentant le support de l'information génétique <sup>(3)</sup>

Dans le noyau des cellules, l'ADN est transcrit en acide ribonucléique (ARN), qui subit une étape d'épissage : les régions non-codantes (introns) sont supprimées. Les exons sont rassemblés, et la molécule d'ARN messager (ARNm) ainsi formée est exportée en dehors du noyau dans le cytoplasme, où elle est traduite en une suite d'acides aminés, formant une protéine jouant un rôle particulier dans le fonctionnement de la cellule (Figure 2).

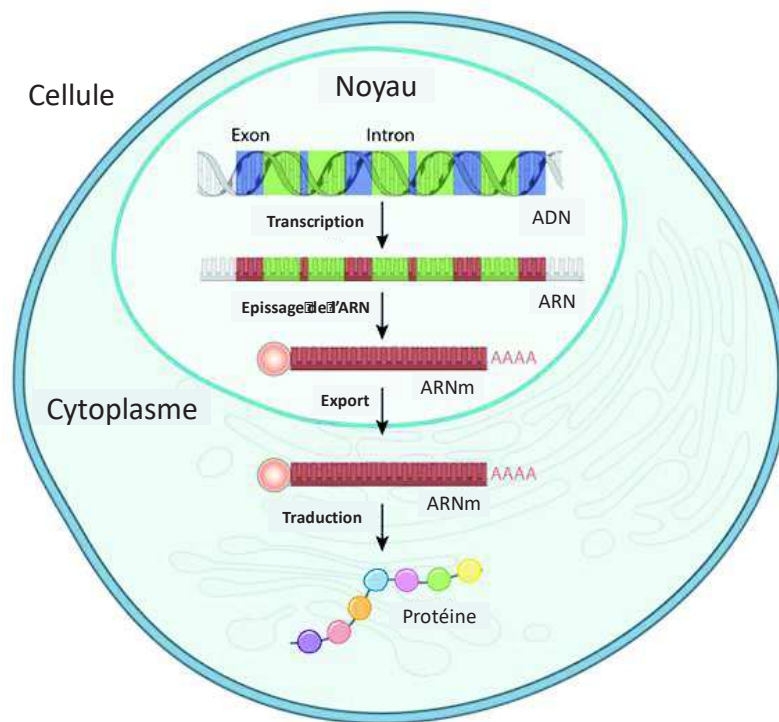


Figure 2 : Mécanisme de l'expression des gènes <sup>(4)</sup>

Cependant, il arrive parfois que l'ADN présente des anomalies, responsables des maladies génétiques. On distingue trois formes de maladies génétiques en fonction de l'altération à leur origine : les maladies chromosomiques, monogéniques et polygéniques<sup>(1)</sup>. Une maladie chromosomique est liée à un problème au niveau de la structure du chromosome ou du nombre de chromosomes présents dans la cellule. Par exemple lorsqu'un chromosome supplémentaire est présent sur une des paires de chromosomes, on parle de trisomie ; en l'absence d'un chromosome sur une des paires on parle de monosomie. Si l'anomalie résulte de la modification de l'ADN, on parle de mutation. Ces modifications peuvent entraîner des dysfonctionnements plus ou moins graves du corps humain : on parle alors de maladie génique. Celle-ci peut être monogénique si la mutation ne concerne qu'un seul gène, ou polygénique quand plusieurs gènes sont touchés<sup>(2)</sup>. Certaines maladies génétiques se manifestent dès la naissance, telles que la mucoviscidose ou la myopathie de Duchenne. D'autres peuvent rester asymptomatiques et ne devenir visibles qu'après plusieurs années ; c'est le cas de la chorée de Huntington, qui se manifeste par une dégénérescence neurologique entraînant d'importants troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. Certaines maladies génétiques sont innées ; elles sont alors transmissibles d'une génération à l'autre. C'est le cas des maladies autosomiques dominantes, autosomiques récessives ou des maladies génétiques liées à l'X (au chromosome X). D'autres sont acquises et peuvent survenir au cours de la vie, à l'instar de certains cancers dus à l'apparition de mutations *de novo* chez les individus atteints.

### 1.1.3. Modes de transmission des maladies génétiques<sup>(5)</sup>

Les maladies monogéniques se transmettent selon les lois de Mendel, suivant quatre modes d'expression et de transmission : dominant ou récessif, et autosomique ou lié à l'X. Chacune des 23 paires de chromosomes constituant le caryotype d'un individu humain est constituée d'un chromosome d'origine maternelle et d'un chromosome d'origine paternelle. Ainsi, pour chaque gène, un individu porte un allèle maternel et un allèle paternel. Les 22 premières paires sont appelées « autosomes », tandis que la 23<sup>ème</sup> paire est constituée des chromosomes sexuels X et Y. Par conséquent, le mode de transmission est dit autosomique si le gène muté est porté par un autosome ; il est dit « lié à l'X » si le gène muté est situé sur le chromosome X.

La transmission est également qualifiée de dominante ou récessive en fonction de l'allèle muté : dans le mode de transmission dominant, la présence d'un seul allèle porteur de la mutation est suffisante pour que la maladie se manifeste. Ainsi, toute personne portant la mutation est atteinte par la maladie. Dans le cas d'une transmission récessive, la présence des deux allèles mutés est nécessaire pour que la maladie se manifeste. Une personne porteuse de la mutation n'est donc pas nécessairement atteinte de la maladie : la présence de l'allèle sain permet de compenser celle de l'allèle muté ; on parle alors de porteur sain. En revanche la mutation peut être transmise à la descendance.

Dans les maladies liées à l'X, le gène muté est présent sur le chromosome X et donc lié à la paire de chromosomes sexuels. Cette paire est constituée de deux chromosomes : XX chez une femme et XY chez un homme. Les femmes possèdent donc deux exemplaires de chaque gène situé sur le chromosome X, alors que les hommes n'en possèdent qu'une seule version d'origine maternelle. Ainsi, la question de la dominance ou de la récessivité ne se pose pas chez les individus de sexe masculin : si le gène est muté, l'individu est atteint (tandis que chez une femme, la présence d'un allèle sain peut compenser la présence du gène défectueux dans le cas d'une maladie récessive).

Des exemples de maladies génétiques sont données dans le Tableau 1 ci-dessous, selon les différents modes de transmission précédemment décrits.

	Autosomique	Liée à l'X
Dominante	Chorée de Huntington Hypercholestérolémie familiale Diabète familial du jeune adulte	Syndrome de l'X fragile Déficit en ornithine transcarbamylase Maladie de Charcot-Marie-Tooth (X1)
Récessive	Mucoviscidose Drépanocytose Thalassémies	Myopathie de Duchenne Hémophilie Daltonisme

Tableau 1 : Exemples de maladies génétiques selon leur mode de transmission

## 1.2. Les progrès de la génétique médicale

La mise au point de la technique d'amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans les années 1980 a marqué un tournant décisif dans l'évolution des techniques d'analyse en biologie moléculaire. Parallèlement, le séquençage du génome humain a révolutionné le domaine de la génétique médicale. Le séquençage consiste à déterminer la séquence, c'est-à-dire l'enchaînement des quatre bases de l'ADN (A, T, G, C pour Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine). Le programme de séquençage du génome humain, appelé *Human Genome Project*, a été initié en 1990 et a abouti en 2003 à une carte génétique complète, résultat d'une coopération scientifique internationale, pour un coût de 3 milliards de dollars<sup>(6)</sup>. L'objectif de ce projet était non seulement de déterminer la séquence, mais également d'identifier et de cartographier tous les gènes constituant le génome humain, d'un point de vue physique et fonctionnel.

En 2007, le laboratoire Roche a commercialisé le premier séquenceur à haut débit, 500 fois plus rapide et 50 fois moins cher que la méthode de Sanger utilisée précédemment. Suite au développement du séquençage à haut et très haut débit de l'ADN, le coût et la durée du séquençage ont drastiquement diminué : en 2010, il ne fallait plus que quelques jours et moins de 2000 dollars pour séquencer un génome humain (Figure 3). En 2020, cette analyse coûte moins de 1000 dollars et peut être réalisée en quelques heures avec les automates les plus performants<sup>(7)</sup>.

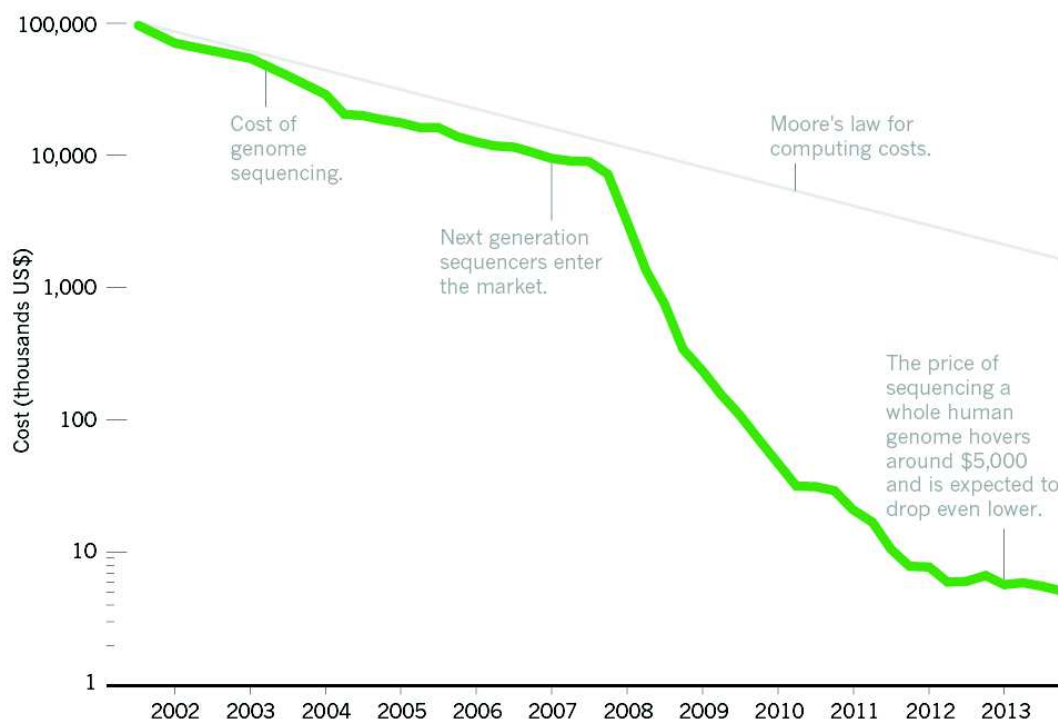


Figure 3 : Evolution du coût de séquençage d'un génome humain <sup>(8)</sup>

La loi de Moore, énoncée en 1965, est une règle selon laquelle la puissance de traitement des ordinateurs augmente de façon exponentielle tous les deux ans. Parallèlement à l'augmentation de la performance des processeurs, elle prédit une diminution exponentielle des coûts. Dans les premières années suivant la fin du Human Genome Project, le coût de séquençage du génome humain a suivi la loi de Moore, puis ce coût a drastiquement diminué à partir de 2007.

Ces progrès des techniques de séquençage ont permis des avancées considérables en termes de recherche dans la compréhension des maladies génétiques. La génomique, branche de la génétique qui étudie l'information génétique totale d'un organisme, consiste à comprendre l'implication des gènes dans les fonctions biologiques et à déterminer quelles mutations sont à l'origine de maladies génétiques. Ainsi, les gènes responsables de plus de 3500 maladies génétiques ont été identifiés, marquant un pas décisif vers le traitement de ces maladies. En effet, en connaissant le gène impliqué dans une maladie, il est possible d'envisager des traitements innovants visant à corriger directement ce gène défectueux.

Les activités de dépistage et de diagnostic ont également bénéficié des progrès des techniques de séquençage de l'ADN, facilitant la réalisation des tests génétiques. Actuellement, la législation française permet la réalisation de tests génétiques dans différents cas <sup>(9)</sup> :

- Un test diagnostic peut être réalisé chez un individu présentant des symptômes, afin d'identifier la maladie et d'adapter la prise en charge du patient,
- Un test prédictif d'une maladie permet de rechercher une prédisposition génétique chez un patient faisant partie d'une famille à risque,
- Les tests de diagnostic prénatal et préimplantatoire, proposés aux couples où l'un des parents est atteint d'une maladie génétique grave, consistent à détecter cette maladie, respectivement chez un embryon ou chez un fœtus (dans le cas des fécondations *in vitro*) <sup>(10)</sup>,
- Enfin, le dépistage néonatal permet de dépister chez les nouveau-nés certaines maladies génétiques pouvant occasionner des symptômes dès la naissance. Ce dépistage précoce permet de mettre en place des traitements et prise en charge adaptés, et ainsi de prévenir la survenue de complications graves chez les enfants atteints, voire de handicap définitif.

Dans le cadre du programme national de dépistage néonatal français <sup>(11)</sup>, le test de Guthrie, qui consiste à prélever quelques gouttes de sang par une piqûre sur le talon du nouveau-né, permet de dépister cinq maladies dont quatre sont des maladies génétiques : la phénylcétonurie, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la drépanocytose et la mucoviscidose. Prenons l'exemple de la mucoviscidose, une maladie génétique autosomique récessive due à une mutation du gène codant pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) <sup>(12)</sup>. La mutation Delta F508 est responsable d'une forme sévère de la maladie, touchant principalement les fonctions respiratoire et gastro-intestinale avec notamment des insuffisances respiratoire et pancréatique. Le dépistage néonatal de cette maladie génétique est systématiquement proposé dans les maternités en France depuis 2002. Dans un premier temps, le dosage de la trypsine

immunoréactive dans le sang prélevé chez le nouveau-né donne une première indication : un taux élevé de trypsine est associé à un risque élevé de mucoviscidose. Si le taux est élevé, dans un second temps, les mutations du gène CFTR seront recherchées par des techniques de séquençage, afin de confirmer le diagnostic.

Ainsi, les progrès réalisés dans la compréhension des maladies génétiques, associés au développement des techniques de biologie moléculaire et d'analyse, ont permis une amélioration considérable de la prise en charge des maladies génétiques, du diagnostic jusqu'au traitement (Figure 4).

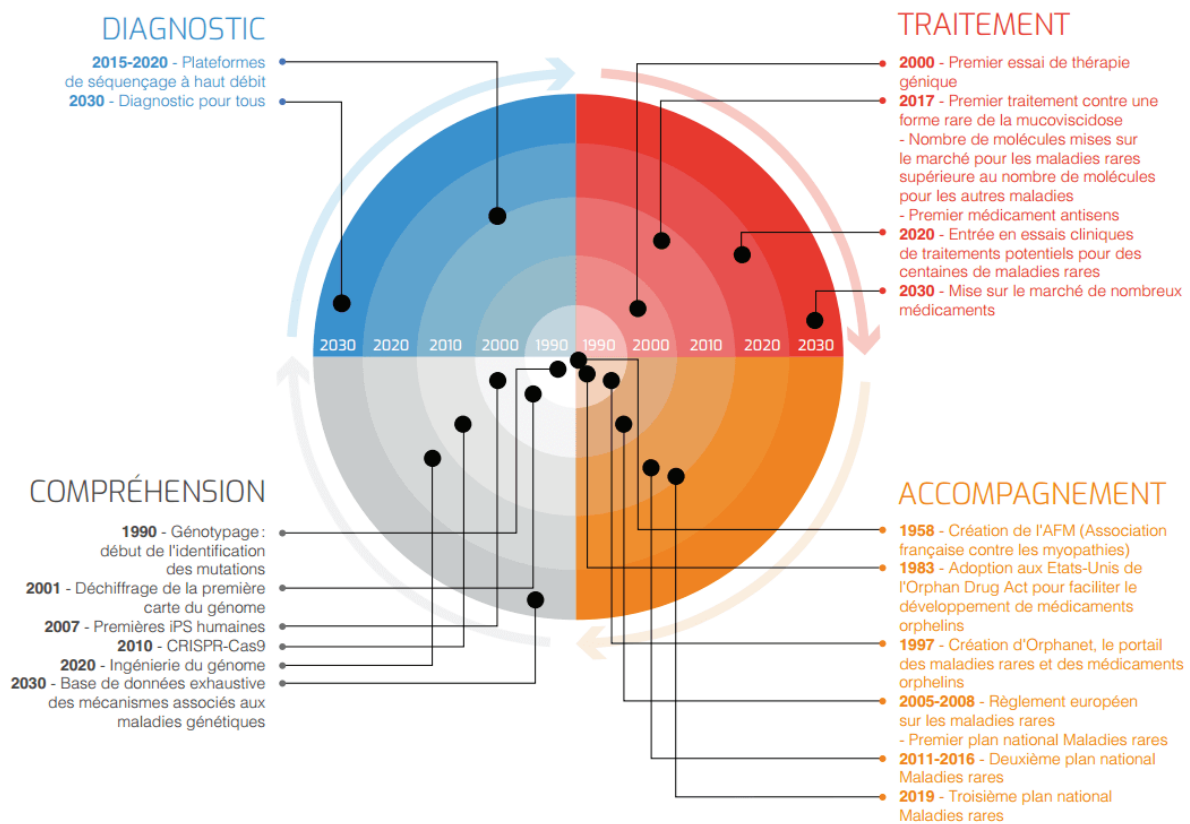


Figure 4 : Evolution et perspectives de la prise en charge des maladies génétiques (13)

### 1.3. Objectifs thérapeutiques

En fonction de la physiopathologie de la maladie à traiter, différentes approches de correction d'une anomalie génétique peuvent être utilisées :

- Apporter une copie normale d'un gène muté, dans le but de compenser le défaut génétique ;
- Inhiber l'expression d'un gène muté, dans le cas où la protéine produite est délétère. Cette inhibition peut être partielle ou totale, et est indiquée pour les maladies à transmission dominante ;

- Modifier l'expression d'un gène muté, dans le but de limiter les conséquences de la mutation ;
- Ajouter un nouveau gène pour créer une nouvelle fonction, par exemple conférer aux lymphocytes T des propriétés leur permettant de combattre certains cancers ;
- Corriger une mutation *in situ* (« chirurgie » du génome).

La dernière stratégie sera décrite par la suite (partie I.2.5). Les deux principales stratégies d'augmentation de gène (*gene augmentation*) et de suppression de gène (*gene suppression*) sont les plus utilisées en clinique à l'heure actuelle. Elles sont résumées dans la [Figure 5](#).

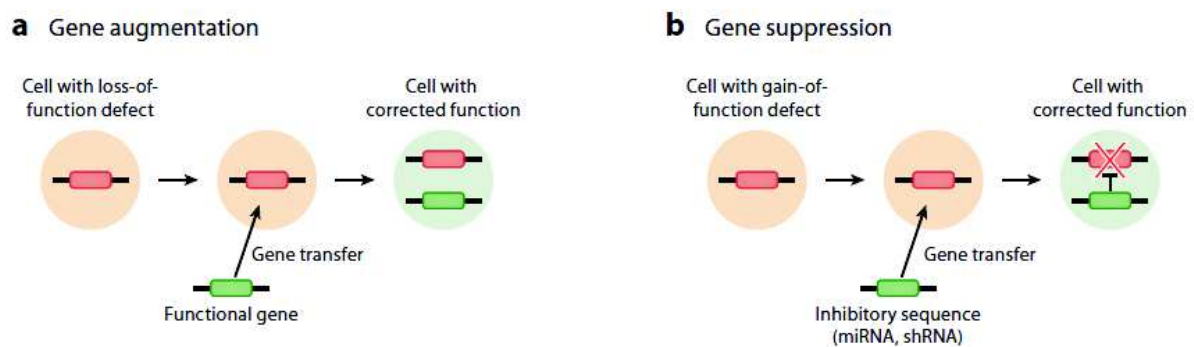


Figure 5 : Stratégies de "gene augmentation" et de "gene suppression" (14)

La stratégie de « *augmentation gene therapy* » trouve son application dans les maladies dues à un déficit ou une absence de protéine. Le but est de restaurer les fonctions cellulaires en apportant une copie normale du gène muté, et d'obtenir une expression à long terme du gène transféré, à un niveau suffisant pour conserver les effets thérapeutiques (14). Une copie fonctionnelle du gène est apportée, sans toucher à la version défectueuse du gène du patient, qui reste présente dans les cellules. Cette stratégie est applicable principalement pour les maladies génétiques récessives, par exemple l'amaurose congénitale de Leber, les hémophilies ou encore l'amyotrophie spinale.

A l'inverse, la stratégie de « *gene suppression* » ou « *gene silencing* » a pour but d'empêcher l'expression délétère du gène muté, en amenant dans les cellules à traiter une séquence inhibitrice. En effet dans certaines maladies, la mutation entraîne la production d'une protéine défectueuse dont l'accumulation peut être toxique. C'est le cas par exemple de l'amylose à transthyrétine héréditaire : le gène muté de la transthyrétine conduit à la formation d'une protéine anormale toxique, qui s'accumule sous formes de dépôts fibrillaires dans les tissus et les organes, altérant leurs fonctions. L'apport d'un ARN interférent va entraîner la dégradation de l'ARNm de la transthyrétine mutée, diminuant son accumulation toxique dans les organes ([Figure 6](#)). Ainsi, le patisiran (Onpattro®), premier médicament constitué d'un ARN interférent, a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe en 2018, pour l'indication « Amylose héréditaire à



transthyréline chez les patients adultes atteints de polyneuropathie de stade 1 ou de stade 2 » (15), (16).

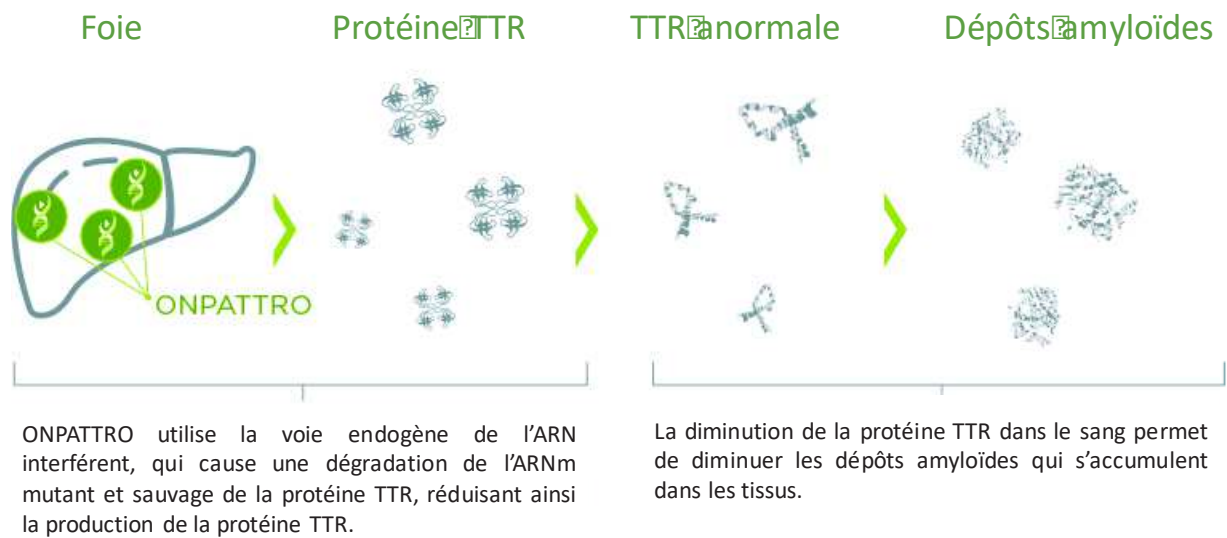


Figure 6 : Physiopathologie simplifiée de l'amylose héréditaire à transthyréline et mécanisme d'action du médicament Onpattro (17)

Les médicaments développés dans le cadre de la stratégie *gene suppression* sont actuellement principalement constitués d'ARN interférents ou d'oligonucléotides antisens, qui n'entrent pas dans la catégorie des médicaments de thérapie génique (leur cible étant l'ARNm et non l'ADN). Il est à noter qu'à l'heure actuelle, les traitements de thérapie génique à proprement parler concernent la stratégie de *gene augmentation*.

#### 1.4. Concept du médicament de thérapie génique

Jusqu'à la mise en place d'essais cliniques de thérapie génique, les maladies génétiques ne disposaient d'aucun traitement spécifique. En effet, la stratégie palliative était d'apporter au patient la protéine manquante ou non fonctionnelle, ou d'administrer des traitements symptomatiques pour améliorer la qualité de vie des patients. L'identification des gènes responsables des maladies génétiques a mené aux premiers essais de thérapie génique dans les années 1990, entrepris dans le but de guérir ces maladies. La stratégie thérapeutique n'est plus d'administrer la protéine manquante ou non-fonctionnelle issue du gène muté (quand cela est possible), mais de compenser le gène défectueux chez le patient, et non de traiter la conséquence de l'anomalie génétique.

Cette stratégie peut être illustrée par l'exemple de l'hémophilie, une maladie génétique de la coagulation sanguine caractérisée par un déficit d'un des facteurs de la coagulation. L'hémophilie B, causée par une mutation du gène FIX, se traduit par un déficit ou une absence totale de facteur

IX, entraînant des hémorragies spontanées et/ou prolongées <sup>(18)</sup>. Le traitement substitutif consiste à administrer le facteur IX par voie intraveineuse, plusieurs fois par semaine pour les formes sévères <sup>(19)</sup>. L'effort de développement de ce type de médicament était alors ciblé sur la modification du facteur IX pour augmenter sa durée d'action et ainsi diminuer le nombre d'injections nécessaires.

L'approche de thérapie génique envisagée pour le traitement de l'hémophilie B consiste à apporter une copie normale du gène FIX. A ce jour, un peu moins de 20 études cliniques reposant sur cette stratégie sont en cours <sup>(20)</sup>. Parmi celles-ci, l'étude HOPE-B conduite par la société UniQure montre des résultats prometteurs, avec en phase IIb une augmentation moyenne de 40% de l'activité du facteur IX suite à l'injection de l'AMT-061, médicament expérimental consistant en un vecteur viral AAV5 portant le variant Padua du gène FIX <sup>(21), (22)</sup>.

Les médicaments de thérapie génique ont donc pour objectif de compenser l'anomalie génétique, en utilisant le gène comme solution thérapeutique. Pour cela, un « gène médicament » est construit : il comporte principalement la séquence normale du gène, appelée transgène, associée à des éléments de régulation. Cette séquence d'ADN est prise en charge par un vecteur, système de transport qui va l'amener dans les noyaux des cellules cibles, où se trouve la séquence d'ADN défectueuse à réparer.

### 1.5. Stratégies *in vivo* et *ex vivo*

Deux approches de correction des anomalies génétiques sont actuellement utilisées : la modification génétique des cellules peut être réalisée *in vivo* ou *ex vivo* (Figure 7).

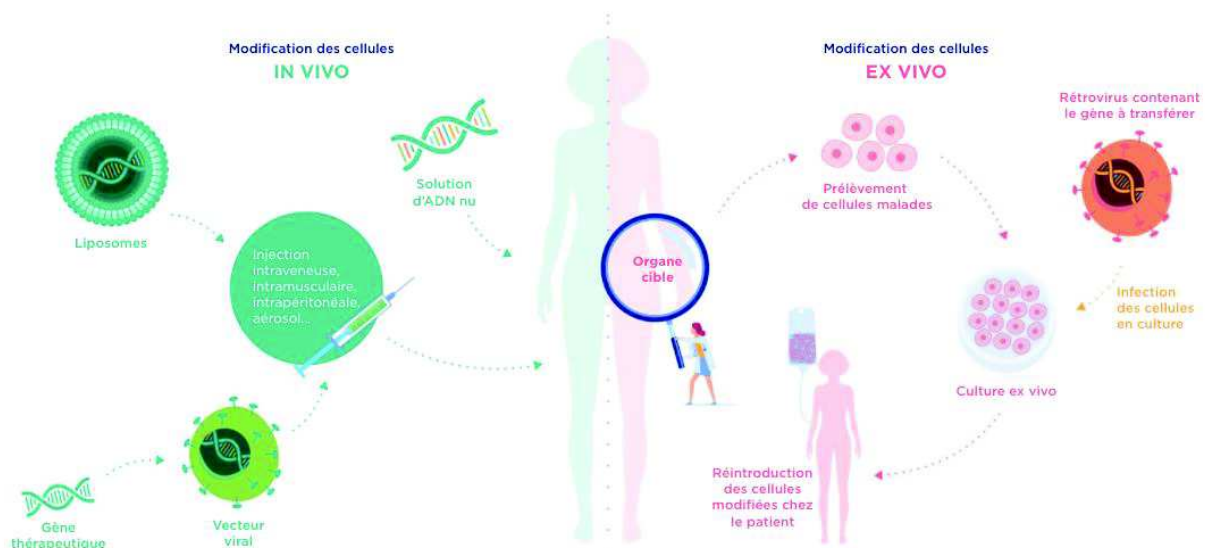


Figure 7 : Les deux voies de la thérapie génique <sup>(23)</sup>

Dans l'approche *in vivo*, le vecteur contenant le gène thérapeutique est injecté chez le patient, directement dans l'organe cible. Cette approche concerne les organes cibles dont les cellules ne peuvent pas être prélevées. Elle permet de traiter, par injection directe des vecteurs dans les cellules du foie, des poumons, des yeux ou des muscles par exemple, des maladies comme l'hémophilie (le foie étant le principal lieu de synthèse des facteurs de la coagulation), la mucoviscidose, les dystrophies rétiniennes ou musculaires. C'est le cas du Luxturna®, médicament approuvé en 2017 dans le traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires résultant de mutations bi-alléliques du gène RPE65, qui contient le gène sain de la protéine RPE65. Il est administré une seule fois dans chaque œil, en injection sous-rétinienne <sup>(24)</sup>.

Dans l'approche *ex vivo*, les cellules cibles du patient (autologue) ou d'un donneur sain (allogénique) sont prélevées et mises en culture en dehors de l'organisme. Elles sont traitées par le complexe transgène/vecteur, et les cellules ainsi modifiées sont réadministrées au patient par voie intraveineuse dans la circulation sanguine. Cette approche permet de cibler une population précise de cellules. Elle est largement utilisée pour modifier génétiquement les cellules souches hématopoïétiques, dans le cadre des maladies touchant les différentes lignées de cellules sanguines, notamment les déficits immunitaires combinés sévères (SCID) <sup>(25)</sup>.

Cette stratégie *ex vivo* est également utilisée dans les immunothérapies anticancéreuses, en suivant trois voies possibles <sup>(26)</sup> :

- Induire l'apoptose des cellules tumorales via l'ajout d'un gène suicide ;
- Utiliser un virus oncolytique qui va se répliquer sélectivement dans les tumeurs ;
- Ou encore modifier génétiquement les cellules immunitaires du patient pour stimuler ses défenses immunitaires.

La pertinence et l'efficacité de cette dernière stratégie sont illustrées par le développement considérable des thérapies à base de CAR-T cells, et la mise sur le marché de deux médicaments « CAR-T » en 2017 :

- Kymriah® (Novartis) pour le traitement des enfants et jeunes adultes jusqu'à 25 ans atteints de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) à cellules B réfractaire, en rechute après greffe ou après la deuxième rechute ou plus, et des adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) en rechute ou réfractaire après la deuxième ligne ou plus d'un traitement systémique <sup>(27)</sup>.

- Yescarta® (Gilead) pour le traitement de deux lymphomes spécifiques et rares : lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB), lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B (LMPGCB)<sup>(28)</sup>.

Leur but est de modifier génétiquement les lymphocytes T cytotoxiques du patient pour leur faire exprimer des récepteurs spécifiques d'antigènes tumoraux. La réponse immunitaire anticancéreuse est donc améliorée et recentrée vers les cellules tumorales.

## 2. Les outils du transfert de gène

### 2.1. Paramètres d'efficacité pour le choix du vecteur

Le gène thérapeutique transféré se présente sous la forme d'une séquence d'ADN, associée à des éléments régulateurs. Il est susceptible d'être dégradé dans l'organisme, et sa nature polyanionique due aux charges négatives de l'ADN ainsi que sa taille l'empêchent de pénétrer passivement dans les cellules. Afin de contourner ces obstacles physiologiques pouvant empêcher le transfert du gène thérapeutique, celui-ci sera associé à un système capable de le compacter, de le protéger des agressions du milieu biologique (comme l'action de certaines enzymes), et de lui permettre de passer les différentes barrières physiologiques pour arriver au niveau de son site d'action : c'est le principe de la **vectorisation** <sup>(26)</sup>. Deux types de vecteurs sont principalement utilisés : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les premiers sont issus de virus connus, modifiés génétiquement pour assurer leur sécurité d'utilisation. Les seconds utilisent des méthodes physiques ou chimiques pour faire parvenir le transgène à sa cible. La séquence thérapeutique ainsi prise en charge par un vecteur, va pouvoir entrer dans le cytoplasme des cellules puis dans le noyau. Les paramètres à prendre en compte dans le choix d'un vecteur peuvent être regroupés en deux classes : ceux impactant l'efficacité du médicament de thérapie génique, et ceux liés à sa sécurité d'utilisation. Ces derniers, concernant notamment les vecteurs viraux, seront décrits par la suite.

Trois principaux paramètres impactant l'efficacité du médicament de thérapie génique doivent être pris en compte <sup>(25)</sup>. Le premier concerne le **ciblage** : en fonction des besoins, le vecteur utilisé doit permettre des interactions spécifiques avec les cellules cibles ; c'est la notion de tropisme cellulaire, particulièrement importante pour les thérapies *in vivo*, dans lesquelles le transgène doit atteindre l'organe cible. Dans le cas des vecteurs viraux, les interactions entre certaines protéines de la capsid ou de l'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires associés, permettent la liaison du vecteur à un type de cellule particulier.

Ensuite, la stratégie relative à la **stabilité d'expression du transgène** diffère en fonction des cellules à modifier <sup>(25)</sup>. Les vecteurs intégratifs, qui permettent l'intégration du transgène dans le

génomique du patient, rendent possible une expression stable à long terme (Figure 8). Par exemple, le traitement par thérapie génique des Déficiences Immunitaires Combinées Sévères (DICS ou SCID) consiste à modifier génétiquement les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules subissent de nombreuses divisions cellulaires, d'une part pour s'autorenouveler et d'autre part pour se différencier en un type cellulaire particulier. Le gène thérapeutique doit donc être intégré dans le génome des cellules souches pour assurer sa transmission aux cellules filles et la persistance de l'effet thérapeutique. L'expression du transgène peut aussi être transitoire dans le cas des vecteurs non-intégratifs. Le transgène est alors présent dans le noyau mais ne s'intègre pas dans le génome hôte, il persiste sous forme épisomale, indépendamment des chromosomes <sup>(25)</sup> (Figure 8). Dans ce cas, le gène thérapeutique perd de son efficacité au fur et à mesure des divisions cellulaires. Cette stratégie peut être utilisée pour cibler des cellules qui se divisent peu ou pas, comme les muscles ou les neurones.

Enfin, la **taille du gène à transférer** doit être considérée : certains vecteurs viraux ne peuvent empaqueter qu'une séquence d'acide nucléique inférieure à 5000 paires de bases (5 kb) <sup>(25)</sup>. A titre d'exemple, le plus grand gène humain connu est celui de la dystrophine, protéine impliquée dans la myopathie de Duchenne, avec une taille supérieure à 2 Mb <sup>(29)</sup>. Ainsi, il est parfois nécessaire de déterminer la séquence minimale du gène permettant l'effet thérapeutique, afin de restreindre sa taille et permettre son encapsidation dans un vecteur viral. A l'inverse des vecteurs viraux, la capacité d'empaquetage des vecteurs non-viraux est théoriquement illimitée.

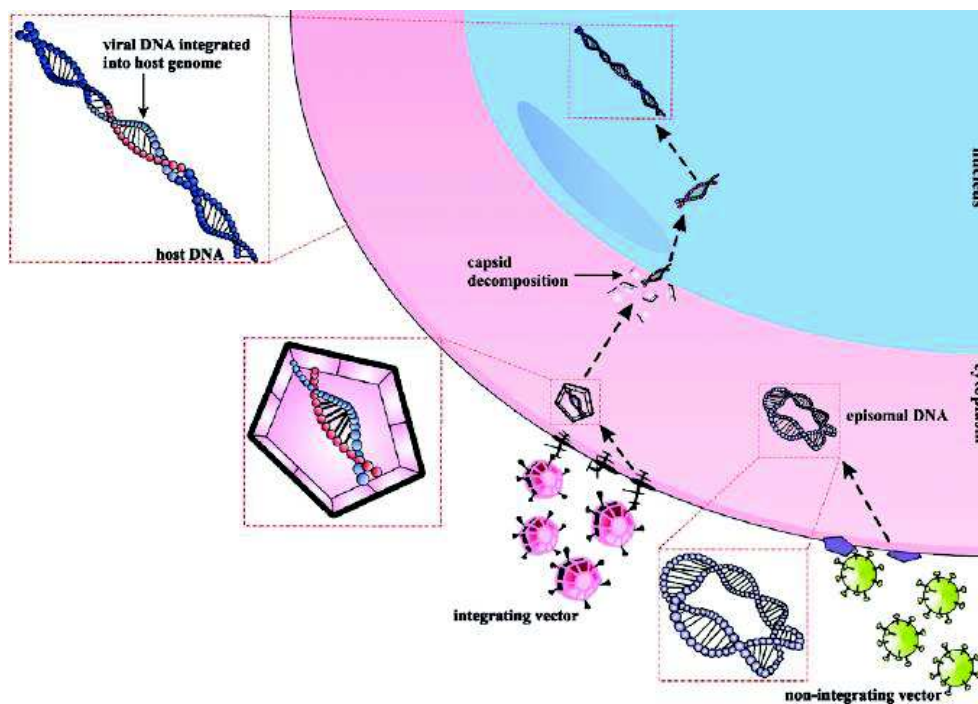


Figure 8 : Principe des vecteurs intégratifs et non-intégratifs <sup>(30)</sup>

## 2.2. Vecteurs viraux

### 2.2.1. Principe d'utilisation de virus modifiés comme vecteurs

L'utilisation de virus modifiés génétiquement (appelés virus recombinants) comme vecteurs de thérapie génique est basée sur leur mode d'action. Les virus sont constitués a minima d'une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN) portant leur information génétique, et d'une capsid, structure protéique qui entoure et protège le génome viral (Figure 9). La capsid possède trois rôles essentiels : protection du génome vis-à-vis du milieu extérieur, attachement des virus nus à la membrane de la cellule hôte, et transport du génome viral à l'intérieur de la cellule. Certains virus peuvent également être enveloppés par une structure lipido-glucido-protéique ; les protéines enchâssées dans l'enveloppe sont appelées spicules.

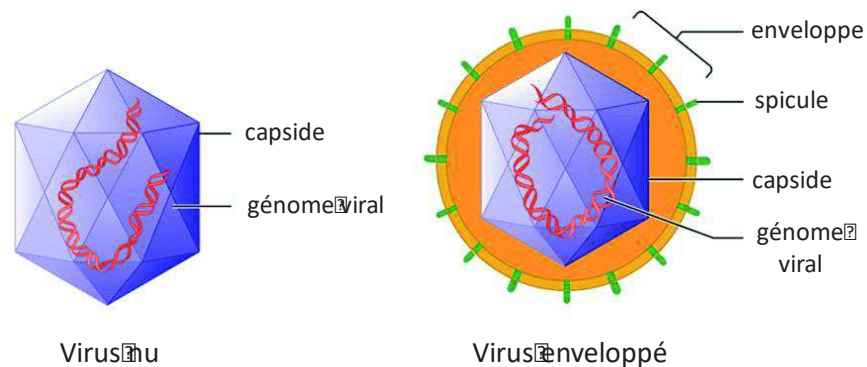


Figure 9 : Structure générale d'un virus <sup>(31)</sup>

Incapables de se répliquer de façon autonome, les virus utilisent la machinerie cellulaire hôte pour leur propre réplication ; ils sont donc capables d'entrer dans les cellules et d'y introduire le matériel génétique qu'ils transportent. C'est cette propriété qui a été « détournée » dans le cadre de la thérapie génique, afin d'acheminer le transgène dans les cellules cibles et jusqu'au noyau <sup>(25)</sup>. En cas d'infection virale, le virus une fois entré dans la cellule cible, utilise les mécanismes de transcription et de traduction de la cellule hôte pour produire de nouvelles protéines virales et répliquer son information génétique. Ce matériel nouvellement formé est assemblé en nouveaux virions, qui sont libérés en dehors de la cellule par bourgeonnement ou lors de la lyse cellulaire. Dans le cadre de la thérapie génique, la propriété d'infection des virus est utilisée pour acheminer le gène thérapeutique jusqu'à ses cellules cibles <sup>(25)</sup>, et leur propriété de réplication est utilisée pour leur fabrication (le principe de production des vecteurs viraux sera détaillé dans la partie II). Le principe est donc de produire des vecteurs viraux non pathogènes, contenant le gène thérapeutique, et capables d'entrer dans les cellules cibles du patient. Pour bloquer la virulence du virus, un ou plusieurs gènes viraux indispensables à sa pathogénicité, codant par exemple pour

les protéines de capsid ou certaines enzymes, sont délétés et remplacés par le gène thérapeutique.

Trois types de virus sont majoritairement utilisés comme vecteurs de thérapie génique : les vecteurs lentiviraux, les vecteurs adénoviraux, et les vecteurs adéno-associés (AAV). Les vecteurs viraux sont impliqués dans les trois quarts des essais cliniques de thérapie génique.

### 2.2.2. Paramètres de sécurité liés aux vecteurs viraux

Parallèlement aux paramètres liés à l'efficacité du médicament de thérapie génique décrits précédemment, des paramètres impactant leur sécurité d'utilisation doivent être évalués lors du développement de telles thérapies. La plupart de ces paramètres sont spécifiques à l'utilisation de vecteurs viraux.

Le premier point est lié à la **capacité de recombinaison** du virus, c'est-à-dire le risque de réobtenir le virus natif par réarrangement du génome viral. L'utilisation de virus génétiquement instables est interdite afin de limiter ce risque de recombinaison. Les stratégies de production (décrites par la suite partie III.A.2) permettent également de solutionner cette problématique.

Ensuite, la **capacité de répllication** du vecteur doit être prise en compte <sup>(25)</sup>. Les vecteurs viraux utilisés en clinique sont généralement non-réplicatifs : ils ne peuvent pas se répliquer de manière autonome, ce sont des virus recombinants qui ne se répliquent que dans des cellules exprimant les gènes viraux délétés. Ainsi lors de la production de vecteurs viraux, les gènes viraux délétés sont apportés par différents plasmides lors de l'étape de transfection, ce qui permet de limiter la génération de RCV (*Replication Competent Viruses*). Les vecteurs ainsi produits, en l'absence des plasmides portant les gènes de pathogénicité, ne peuvent pas se répliquer.

L'administration de vecteurs viraux présente un risque de déclencher chez le patient une réaction immunitaire dirigée contre ce vecteur. Cette problématique d'**immunogénicité** est particulièrement importante pour les stratégies *in vivo*. En effet, si l'organisme a déjà rencontré le virus, une réponse immunitaire contre le vecteur viral va être déclenchée, menant à un échec de la thérapie mais aussi potentiellement à de graves effets indésirables <sup>(25)</sup>.

Dans le cas des vecteurs intégratifs, le **contrôle de l'insertion du transgène** doit être maîtrisé. De fait, l'intégration du génome viral peut entraîner des modifications profondes du génome cellulaire telles que des délétions ou des duplications. Une insertion aléatoire, mal connue ou mal contrôlée dans le génome hôte présente un risque de mutagénèse insertionnelle, pouvant provoquer une génotoxicité voire le développement de cancers <sup>(32)</sup>.

Contrairement aux quatre points de vigilance évoqués précédemment, le dernier point concernant la **régulation de la transcription** ne concerne pas spécifiquement les vecteurs viraux mais s'applique à tout type de vecteur. L'ajout de promoteurs spécifiques et de séquences de régulation dans la construction génique contenant le gène thérapeutique permet une régulation

spatiale (dans l'organe voulu) et temporelle (au moment voulu) de son expression. Ces systèmes permettent de maîtriser le risque de surexpression du transgène, ou de son expression en dehors des organes cibles <sup>(25)</sup>.

Il n'y a donc pas de vecteur « idéal », tous les paramètres précédemment cités relatifs à l'efficacité et à la sécurité d'utilisation des vecteurs doivent être pris en compte pour choisir et développer le vecteur le plus adapté à la pathologie à traiter.

### 2.2.3. Vecteurs rétroviraux

Les premiers vecteurs viraux utilisés en thérapie génique ont été les vecteurs rétroviraux, dérivés du virus de la leucémie murine. Ils permettent l'intégration du transgène dans le génome via une enzyme, l'intégrase, et assurent sa transmission aux cellules filles issues des divisions cellulaires, sans perte de l'information génétique au cours du temps <sup>(33)</sup>. Ce sont des virus à ARN, qui entrent dans la cellule cible par endocytose (Figure 10). Une fois dans le cytoplasme, une étape de décapsidation permet de libérer le génome viral sous forme d'ARN. Celui-ci est rétrotranscrit en ADN sous l'action d'une transcriptase inverse. C'est à ce stade qu'intervient l'intégrase, permettant l'intégration du matériel génétique viral dans le génome hôte et assurant sa transcription et la production de nouvelles particules virales.

Les rétrovirus ont une capacité d'empaquetage d'environ 8 kb. Historiquement, les **gamma-rétrovirus** dérivés de la leucémie murine ont été les premiers utilisés dans les années 1980 <sup>(25)</sup>. Ces vecteurs sont capables d'infecter uniquement les cellules en division, et permettent une expression à long terme du transgène. Avec cette première génération de vecteurs viraux, les sites d'insertion dans le génome étaient peu maîtrisés et des accidents liés à l'intégration du transgène au niveau d'une séquence « pro-oncogène » de l'ADN du patient ont conduit au développement de cancers et de décès <sup>(34)</sup>.

Les vecteurs gamma-rétroviraux ont donc été progressivement délaissés au profit des **vecteurs lentiviraux**, dérivés du VIH, qui semblent avoir un profil d'intégration plus sûr que celui des gamma-rétrovirus, pour une capacité d'empaquetage équivalente de 8 kb <sup>(26)</sup>. Les lentivirus constituent un sous-groupe de la famille des rétrovirus et permettent également une expression stable du transgène de par leur intégration dans le génome de la cellule hôte ; ils infectent préférentiellement les cellules hématopoïétiques. Contrairement aux gamma-rétrovirus, ils sont capables d'infecter aussi bien des cellules en division que des cellules quiescentes <sup>(25)</sup>. Différentes générations de lentivecteurs recombinants ont été mises au point, améliorant à chaque génération leur profil de sécurité <sup>(35)</sup>. Ces vecteurs intégratifs sont principalement utilisés dans les stratégies *ex vivo*.



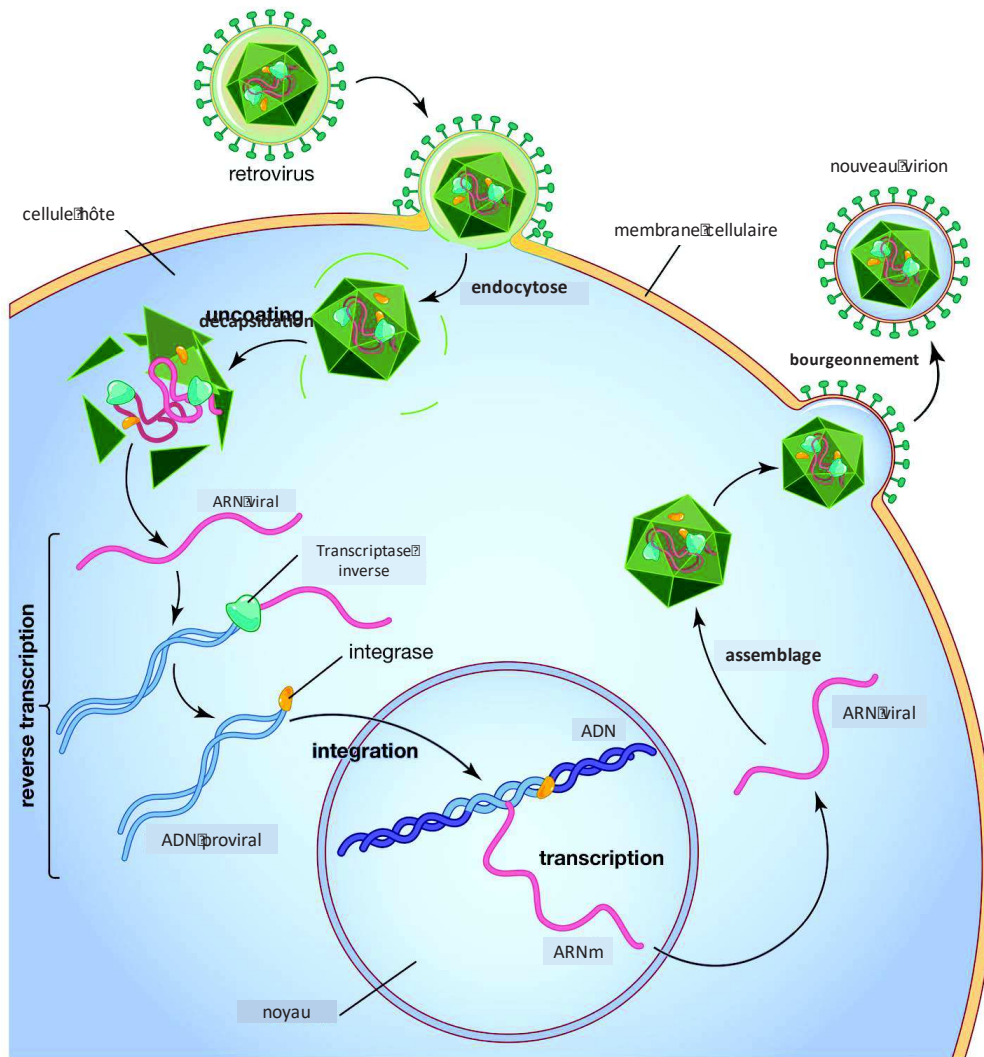


Figure 10 : Cycle viral d'un rétrovirus <sup>(36)</sup>

#### 2.2.4. Vecteurs adénoviraux

Les adénovirus ont été très utilisés au début des essais cliniques de thérapie génique. Ce sont des virus non-enveloppés d'une centaine de nanomètres de diamètre. Ces virus à ADN sont non-intégratifs et ont une capacité d'empaquetage pouvant aller jusqu'à 8 kb <sup>(37)</sup>. Ils peuvent cibler les cellules quiescentes et les cellules en division en se liant à la protéine CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*). Les adénovirus sont certes peu nocifs mais fréquemment associés à des réactions de défense immunitaire <sup>(38)</sup>, car la majorité de la population a déjà été en contact avec des adénovirus, responsables d'infections des voies aériennes supérieures le plus souvent bénignes. Ils permettent un niveau d'expression élevé mais transitoire du transgène, nécessitant des injections répétées pour maintenir l'effet thérapeutique. Par exemple dans le traitement de la mucoviscidose, le renouvellement régulier des cellules de l'épithélium respiratoire requiert des injections répétées de vecteurs, ce qui était impossible à cause de leur importante immunogénicité <sup>(39)</sup>. Une nouvelle génération d'adénovirus helper-dépendants, appelés *gutless adenoviruses*, a été

développée afin de pallier aux différents inconvénients liés à l'utilisation des adénovirus comme vecteurs de thérapie génique <sup>(40)</sup>. Dans ces vecteurs *gutless*, tous les gènes de l'adénovirus sont délétés et remplacés par la construction génique thérapeutique ; les gènes nécessaires à la réplication et à l'empaquetage du virus sont apportés séparément lors de la production des vecteurs. La problématique associée à l'immunogénicité des adénovirus est ainsi solutionnée, et ces vecteurs offrent de plus une capacité d'empaquetage bien supérieure à l'initiale, pouvant aller jusqu'à 35 kb.

### 2.2.5. Virus adéno-associés

Les AAV (*Adeno-Associated Virus*) appartiennent à la famille des parvovirus, ce sont des virus à ADN répandus chez l'homme mais peu inflammatoires ou pathogènes. Ils peuvent infecter divers types cellulaires, en division ou quiescents. Leur structure est très simple, et leur petite taille (quelques dizaines de nanomètres de diamètre) implique une capacité d'empaquetage beaucoup plus faible que celle des adénovirus, inférieure à 4,8 kb. A l'instar des adénovirus *gutless*, les AAV, pour se répliquer, ont besoin d'un virus auxiliaire « helper », qui peut être un adénovirus ou un herpes virus par exemple <sup>(41)</sup>. En effet, en cas de co-infection de la cellule cible par le virus helper, l'AAV va se répliquer dans la cellule et produire de nouveaux virions ; on parle de cycle lytique (Figure 11). En l'absence de virus helper, le génome viral de l'AAV va s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, au niveau du site AAVS1 (*adeno-associated virus integration site 1*) du chromosome 19 ; c'est le cycle lysogénique. Il n'y a dans ce cas pas de production de nouveaux virus. Lors de la production de vecteurs AAV, le but est de faire répliquer le virus afin de produire du vecteur ; un plasmide helper sera donc amené lors de la transfection des cellules productrices, afin de permettre cette production de nouveaux vecteurs viraux contenant le gène thérapeutique.

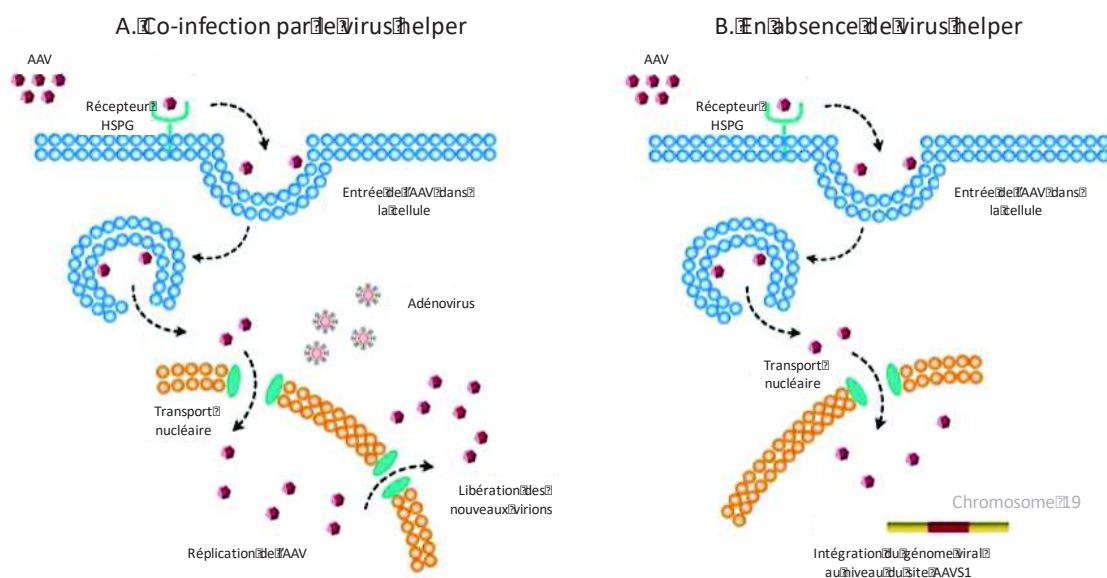


Figure 11 : Cycle viral d'un AAV <sup>(42)</sup>

La propriété intégrative du virus AAV sauvage en l'absence de virus helper ne s'applique pas aux vecteurs AAV recombinants ; en effet, ces derniers n'expriment pas les protéines virales Rep, qui sont indispensables à l'intégration du génome viral dans celui de la cellule cible. Le génome d'un virus AAV à l'état sauvage contient trois cadres de lecture ouverts (Figure 12) : rep, codant pour quatre protéines régulatrices (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) ; cap1 codant pour trois protéines structurales (VP1, VP2 et VP3), et cap2 qui porte l'information génétique d'une protéine chaperonne AAP (*assembly-activating protein*)<sup>(43)</sup>. Les régions ITR (*inverted terminal repeats*) forment des structures palindromiques complexes essentielles pour la répllication du génome viral et son encapsidation ; p5, p19 et p40 désignent les différents promoteurs, zones à partir desquelles démarre la transcription de l'ADN viral. La région polyA correspond à un signal de polyadénylation, essentiel pour la maturation et l'activité de l'ARNm transcrit.

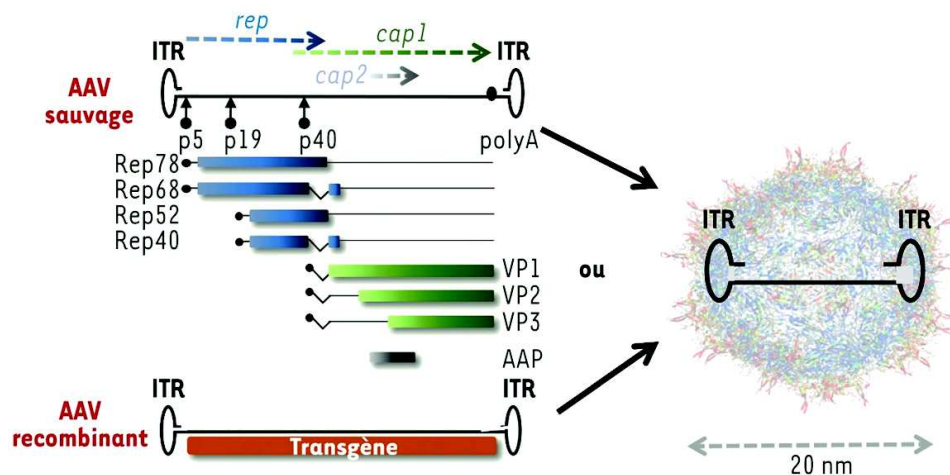


Figure 12 : Génome viral d'un AAV sauvage et d'un AAV recombinant<sup>(43)</sup>

Le génome du vecteur AAV recombinant est obtenu en remplaçant les gènes viraux rep et cap par une cassette d'expression du transgène qui contient au minimum, un promoteur, un ADN complémentaire (ADNc) codant pour le gène thérapeutique et un signal de polyA. Les ITR sont donc les seules séquences d'origine virale présentes dans le vecteur rAAV. La construction génique thérapeutique est ainsi construite, par modification génétique du génome viral sauvage. Un des avantages spécifiques des AAV est leur tropisme cellulaire, qui varie en fonction du sérotype<sup>(44)</sup>. De nombreux sérotypes d'AAV ont été découverts ces dernières décennies et à ce jour, douze sérotypes d'AAV et plus de 100 variants ont été isolés. Les différences principales au niveau du génome de ces différents sérotypes concernent les régions hypervariables de la capsid, responsables du tropisme des AAV. Les gènes codants pour les protéines de capsid peuvent être modifiés afin d'améliorer et d'optimiser cette spécificité<sup>(45), (46)</sup>. Sept sérotypes différents sont

principalement utilisés en clinique, permettant une meilleure spécificité d'interaction des vecteurs avec leurs cellules cibles préférentielles (Figure 13).

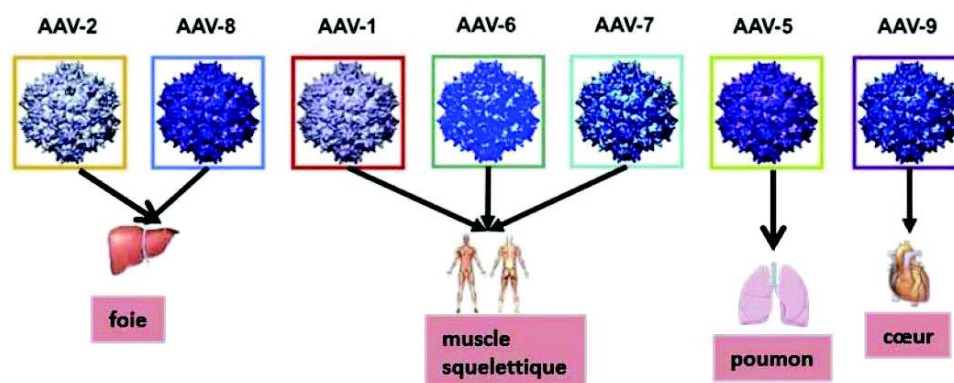


Figure 13 : Sérotypes d'AAV les plus couramment utilisés pour le transfert de gènes et leurs tropismes préférentiels respectifs (26)

De par ces différentes caractéristiques, les vecteurs viraux AAV sont largement utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique, en particulier pour les stratégies *in vivo* où le vecteur est injecté directement dans l'organe cible, potentialisant les chances d'atteindre les cellules cibles. Ainsi, les vecteurs lentiviraux, adénoviraux et AAV sont les plus utilisés en clinique. Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau 2, elles doivent être considérées au cas par cas lors du développement des médicaments de thérapie génique.

	Rétrovirus	Adénovirus	AAV
<b>CARACTERISTIQUES DU VIRUS</b>			
Taille	≈ 80 - 100 nm	≈ 90 - 100 nm	≈ 30 nm
Type d'acide nucléique	ARN	ADN	ADN
Enveloppe	Oui	Non	Non
Récepteur cellulaire	Récepteur CD4	Récepteur CAR	Récepteur HSPG
<b>EFFICACITE</b>			
Ciblage / tropisme	Spectre large	Spectre large	Ciblage spécifique selon sérotype
Stabilité d'expression du transgène	Expression à long terme	Expression à court terme efficace (semaines / mois)	Expression à moyen-long terme possible (> 1 an)
Capacité d'empaquetage	8 kb	8 - 30 kb	4,5 kb
Infection de cellules quiescentes	Non pour les gamma-rétrovirus Oui pour les lentivirus	Oui	Oui
<b>SECURITE</b>			
Capacité de réplication	Oui	Possible mais pas un problème majeur	Possible mais pas un problème majeur
Immunogénicité	Faible	Elevée	Faible
Intégration dans le génome hôte	Oui	Non	Non *
Risque de mutagénèse insertionnelle	Oui	Non	Non *

Tableau 2 : Principales caractéristiques des vecteurs viraux

\*Le génome des vecteurs AAV recombinants persiste dans la cellule cible majoritairement sous forme extra-chromosomique. Ceci n'exclut pas la possibilité d'intégration des vecteurs AAV recombinants dans le génome hôte, à un faible niveau (0,1 à 1% des événements d'intégration <sup>(47)</sup>). Ce phénomène, mis en évidence dans le foie de souris, semble dépendant de l'état de prolifération des cellules, de la puissance du promoteur contenu dans la construction génique et de la dose de vecteur injectée. Le risque de génotoxicité et de mutagenèse insertionnelle dû à l'intégration des rAAV dans le génome humain semble très faible : aucune formation de tumeur n'a été rapportée chez des patients atteints d'hémophilie B, durant plus de sept ans post-traitement par AAVr.

Si les vecteurs viraux sont à l'heure actuelle le moyen le plus efficace de transférer des gènes et sont les plus utilisés dans les essais cliniques (les trois quarts des essais en cours les utilisent), leur production reste longue, difficile et coûteuse. C'est pourquoi d'autres types de vecteurs ont été développés, faisant appel non pas à des virus mais à des méthodes physiques ou chimiques pour faire parvenir le gène thérapeutique jusqu'aux cellules cibles.

### 2.3. Vecteurs synthétiques

Parallèlement aux vecteurs viraux, d'autres méthodes de transfert de gènes ont été mises au point, avec des étapes de conception plus simples et une production moins coûteuse que celle des vecteurs viraux. Des améliorations doivent encore être apportées à ces méthodes de transfert, qui, si elles ont montré une efficacité *in vitro*, ne sont que peu utilisées dans les essais cliniques.

Les vecteurs synthétiques permettent de transférer de l'information génétique en compactant l'ADN, assurant ainsi sa protection dans l'organisme, et en interagissant avec les cellules cibles afin d'internaliser l'ADN à transporter jusqu'au noyau, permettant l'expression du transgène. La plupart des vecteurs synthétiques sont des cations (chargés positivement) qui vont interagir avec les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN.

#### 2.3.1. Lipides cationiques

L'utilisation de cations multivalents permet de compacter l'ADN en nanoparticules de l'ordre de 30 à 200 nm, de façon réversible. Les lipides cationiques sont constitués d'une tête polaire qui va interagir avec l'ADN, d'un bras espaceur de longueur variable (jusqu'à huit atomes de carbone), et d'une ancre hydrophobe constituée d'acides gras ou de cholestérols (Figure 14). Les principaux lipides cationiques utilisés pour le transfert de gènes sont présentés en Figure 15.

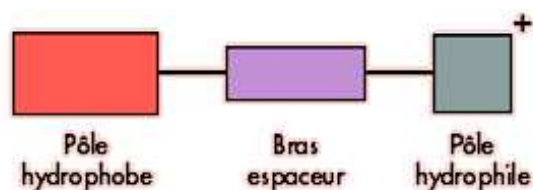


Figure 14 : Structure des lipides cationiques <sup>(48)</sup>

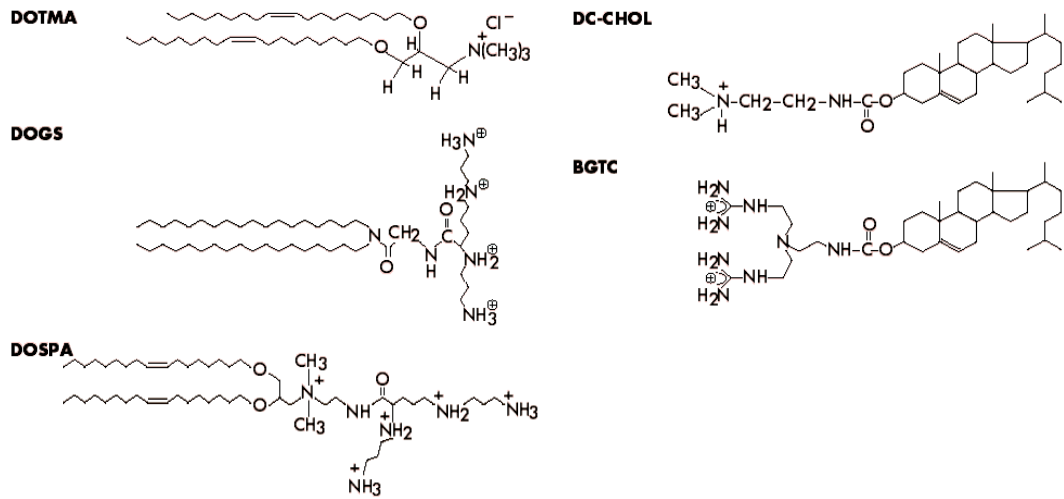


Figure 15 : Principaux lipides cationiques utilisés pour le transfert de gènes <sup>(48)</sup>

Cette structure entraîne, lorsque plusieurs molécules de lipides cationiques se trouvent dans le même milieu, la formation de structures sphériques appelées liposomes, protégeant l'ADN à transporter : les interactions électrostatiques entre les pôles hydrophiles (chargés positivement) et l'ADN (chargé négativement) permettent la formation de lipoplexes (Figure 16). L'ensemble présente au niveau de la surface externe des charges positives (liées aux pôles hydrophiles des lipides cationiques), qui vont interagir avec les charges négatives des membranes cellulaires. Ceci permet l'entrée des complexes dans la cellule : ils sont internalisés par endocytose. Deux voies sont ensuite possibles : libération de l'ADN dans le milieu intracellulaire suite à la rupture de l'endosome, ou dégradation de l'ADN dans le lysosome <sup>(49)</sup>.

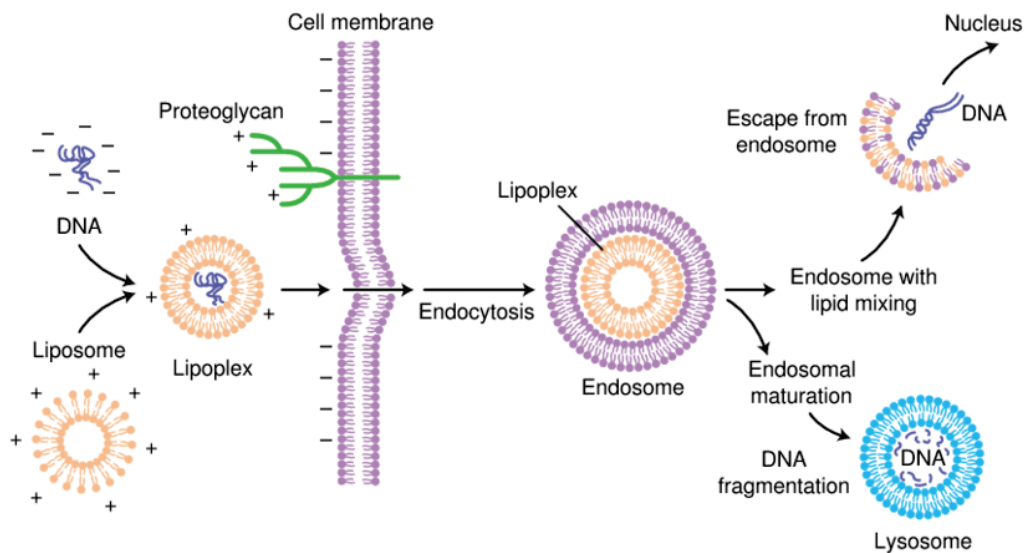


Figure 16 : Mécanisme d'entrée du lipoplexe dans la cellule <sup>(49)</sup>

Contrairement aux vecteurs viraux, les lipoplexes sont des particules inertes, et ont une capacité d'empaquetage de milliers de paires de bases. Malgré cet avantage théorique, ils sont peu efficaces

pour transférer des gènes *in vivo* : après injection par voie intraveineuse, un phénomène d'agrégation survient, entraînant la formation de particules de grande taille qui vont être détruites principalement par le foie <sup>(26)</sup>. Par ailleurs, le transfert du gène dans le noyau n'est pas assuré ; il faudrait transférer un nombre très élevé de molécules d'ADN dans la cellule pour espérer qu'une seule copie du transgène parvienne au noyau, entraînant par ailleurs des problèmes de toxicité. L'efficacité de transfection dépend de paramètres tels que le rapport de charge ADN/lipide, le lipide cationique utilisé, et le type de cellules transfectées. La mise au point de nouveaux lipides cationiques permet d'augmenter l'efficacité du transfert de gène, de diminuer la cytotoxicité des complexes et d'augmenter leur stabilité dans les milieux biologiques, et même d'ajouter des éléments de ciblage cellulaire <sup>(50)</sup>.

### 2.3.2. Polymères cationiques

De même que la complexation entre l'ADN et les lipides cationiques permet de former des lipoplexes, l'utilisation de polymères cationiques pour compacter l'ADN permet de former des polyplexes. Parmi les nombreux polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène, on peut citer la polyéthylèneimine (PEI), la poly-L-lysine (PLL) ou la polyamidoamine (PAMAM) (Figure 17). Ces polymères sont riches en groupements amines et imines (issus des résidus d'acides aminés lysines ou arginines), présentant des charges positives <sup>(51)</sup>. Ainsi, le mécanisme de complexation est le même que pour les lipides cationiques : les interactions électrostatiques entre les charges positives du polymère et les charges négatives de l'ADN permettent la formation du polyplexe. Les propriétés du PEI sont notamment exploitées dans le cadre de la production de vecteurs viraux à l'étape de transfection : le PEI va emballer l'ADN et lui permettre d'entrer dans les cellules (cf partie III.A.2.1).

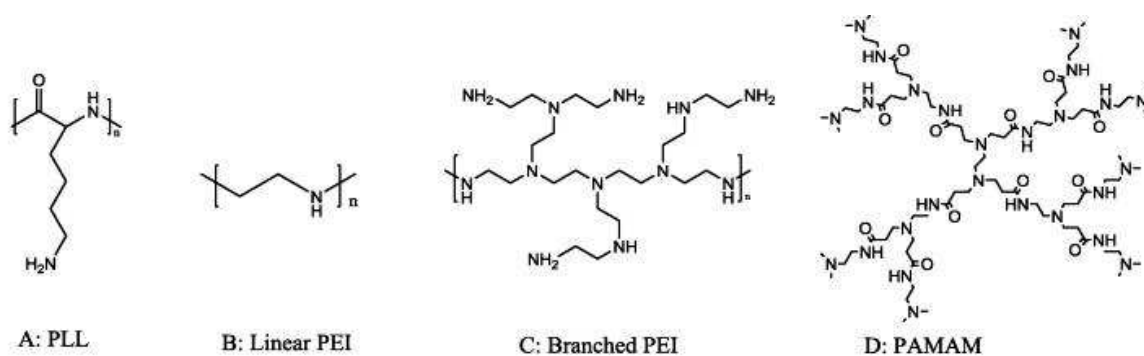


Figure 17 : Structure des principaux polymères cationiques utilisés pour le transfert de gène <sup>(52)</sup>

Comme pour les lipoplexes, des stratégies ont été développées pour améliorer les caractéristiques de ces structures (cytotoxicité, stabilité, efficacité du transfert de gène...). Une seconde génération de vecteurs non viraux a ainsi été développée, combinant les avantages des lipoplexes et des polyplexes : les lipopolyplexes <sup>(50)</sup>. Ces complexes ternaires sont formés d'un liposome cationique, d'un polycation et de la construction génique contenant le gène d'intérêt. Comparativement aux

lipoplexes et polyplexes seuls, les lipopolyplexes ont montré une meilleure stabilité, une cytotoxicité diminuée et une amélioration de l'efficacité du transfert de gène. Le tropisme de ces structures peut également être amélioré par ajout de séquences protéiques de ciblage au niveau de la bicouche lipidique du lipopolyplexe (Figure 18) (53).

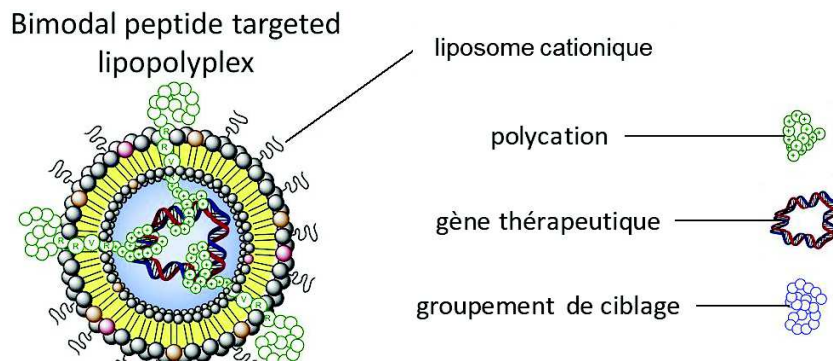


Figure 18 : Structure d'un lipopolyplexe (53)

### 2.3.3. Dendrimères

Les dendrimères sont des molécules constituées de trois parties : un noyau central, entouré d'une ou plusieurs générations de branches, terminées par des groupements fonctionnels à la périphérie de la structure (54) (Figure 19). Sous certaines conditions chimiques ou physiologiques, les dendrimères sont capables de former des polycations au niveau des groupements fonctionnels amines, qui vont interagir avec les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. Le complexe dendrimère-ADN ainsi formé, appelé dendriplexe, va entrer dans la cellule par endocytose selon le même principe que les lipoplexes et polyplexes.

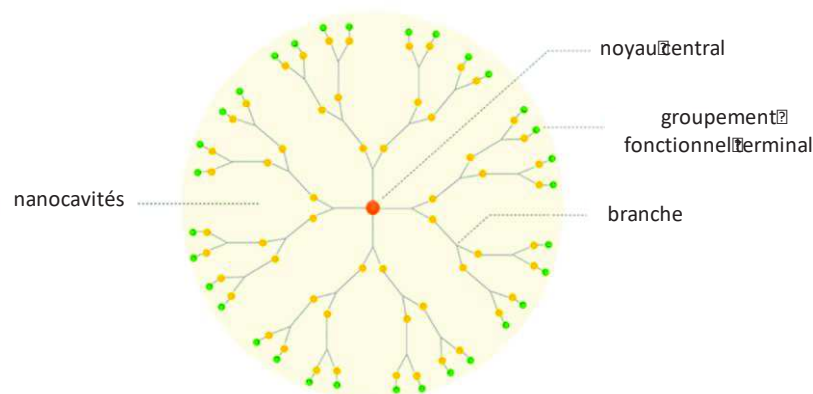


Figure 19 : Structure d'un dendrimère (55)

Les groupements fonctionnels, situés au bout des branches du dendrimère, peuvent être modifiés pour conférer à la structure un ciblage spécifique et réduire sa toxicité. De nombreux types de



dendrimères ont été mis au point : les PAMAM qui sont les plus utilisés, les dendrimères peptides, les glycodendrimères, les PEI-dendrimères...

## 2.4. Méthodes physiques

Parallèlement aux méthodes de vectorisation présentées précédemment, il est possible d'injecter directement l'ADN dans l'organisme, sans passer par un système de vecteur, ou d'utiliser des techniques physiques pour l'aider à pénétrer dans les cellules cibles. Dans ce cas, le transgène est généralement administré sous forme de plasmide : la molécule d'ADN se présente sous une forme circulaire double brin dans une solution tampon. La micro-injection, la biolistique et l'électroporation seront présentées dans ce paragraphe à titre d'exemples, mais de nombreuses autres méthodes physiques de transfert de gènes existent, telles que la sonoporation, l'hydroporation, la magnétofection ou encore l'irradiation laser.

### 2.4.1. Micro-injection

La micro-injection consiste à injecter dans une cellule la solution contenant l'ADN nu grâce à un capillaire en verre (ou une micropipette) d'environ 1 µm de diamètre et un microinjecteur, sous microscope. La manipulation est réalisée à l'aide d'un dispositif permettant un positionnement précis (micromanipulateur) afin de contrôler les mouvements de la micropipette. Cette technique microchirurgicale a été utilisée pour la première fois en 1980 sur des cellules en culture <sup>(56)</sup>. Elle permet l'injection d'une quantité reproductible d'ADN dans chaque cellule, dans le cytoplasme ou dans le noyau. Cette dernière solution est plus efficace, car la présence de nucléases cytoplasmiques entraîne la dégradation de l'ADN nu. Conceptuellement, cette technique est la plus simple pour le transfert de gène en termes de méthode et de matériel. Cependant, l'injection intranucléaire de l'ADN est très fastidieuse et ne permet de traiter qu'une cellule à la fois ; son utilisation dans le cadre de la thérapie génique *in vitro* est donc limitée.

### 2.4.2. Biolistique

La biolistique, initialement développée pour le transfert de gènes dans des cellules végétales, est une méthode utilisant le bombardement de particules pour introduire des acides nucléiques dans des cellules ou tissus. L'ADN à transporter est précipité sur des microparticules d'or ou de tungstène, qui vont être accélérées sous l'effet d'un flux de gaz pressurisé <sup>(57)</sup>. Par exemple, dans le cas du système Helios Gene Gun® de la société Bio-rad, les microparticules recouvertes d'ADN sont appliquées à l'intérieur d'un tube de plastique, lui-même découpé en « cartouches » (Figure 20). Ces cartouches sont placées dans un pistolet, qui va permettre le bombardement des particules en leur conférant une vitesse importante grâce à un flux d'hélium <sup>(58)</sup>. Cette vitesse permet aux particules sortant du canon de pénétrer les membranes cellulaires.

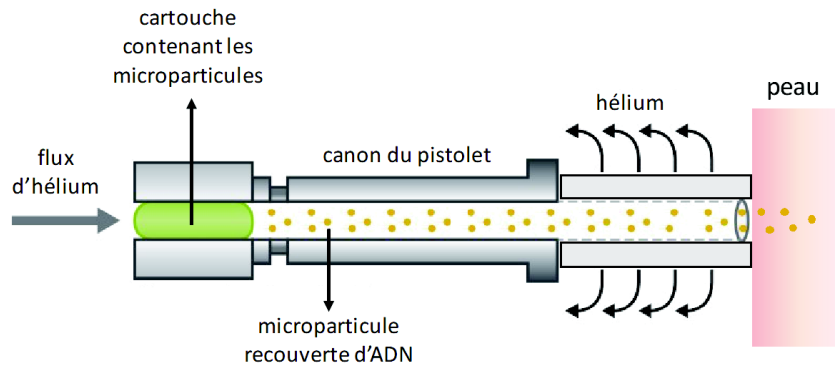


Figure 20 : Mécanisme d'action du gene gun <sup>(59)</sup>

Ce système permet la transfection de cellules *in vitro* ou *in vivo* directement dans les tissus. Cependant, l'efficacité de la méthode *in vivo* est dépendante des tissus cibles et reste limitée par un faible taux de pénétration des particules en profondeur. Cette technique est donc inadaptée pour certains organes cibles, mais permet de traiter par exemple les cellules de la peau <sup>(60)</sup>. L'ajustement de paramètres comme la taille des microparticules ou le flux d'hélium permettent toutefois d'améliorer l'efficacité du transfert de gène.

### 2.4.3. Electroporation

Cette méthode consiste, après injection locale d'ADN, à appliquer de courtes impulsions d'un champ électrique, entraînant une perméabilisation transitoire des membranes cellulaires <sup>(61)</sup> (Figure 21). Des pores hydrophiles se forment alors au niveau de la membrane cellulaire, permettant l'entrée de l'ADN dans la cellule, notamment grâce à un effet électrophorétique.

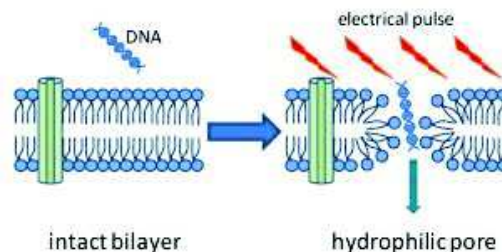


Figure 21 : Mécanisme d'électroporation <sup>(62)</sup>

Parmi les principaux paramètres à prendre en compte pour cette méthode, on peut citer la quantité d'ADN injectée, la durée et le voltage des impulsions, la nature de l'électrode et l'orientation du champ électrique par rapport aux cellules <sup>(63)</sup>. Aucune combinaison de ces variables ne permet d'obtenir une efficacité optimale pour toutes les situations ; ces paramètres doivent être optimisés pour chaque utilisation spécifique. Une optimisation performante des paramètres permet d'améliorer le transfert et l'expression du gène d'un facteur 100 à 1000,

comparé à l'injection d'ADN nu <sup>(61)</sup>. L'électroporation permet de cibler de nombreux tissus (muscles, foies, poumons, peau...), notamment *in vivo*.

## 2.5. Outils d'édition du génome

Simultanément au développement des différentes méthodes de transfert de gène, se sont développés des outils de biologie moléculaire permettant de modifier une séquence d'ADN *in situ* : ce sont les outils d'édition du génome. Ils permettraient d'ajouter, de supprimer ou de corriger un gène en utilisant des nucléases, enzymes permettant de casser le double brin d'ADN au niveau de sites spécifiques et fréquemment qualifiées de « ciseaux moléculaires ». L'utilisation de ces outils lors du transfert de gène pourrait permettre de surmonter la problématique d'insertion aléatoire du transgène dans le génome. Suite au clivage du double brin d'ADN par les nucléases, deux mécanismes endogènes de réparation de l'ADN peuvent entrer en jeu : la réparation par recombinaison homologue ou par jonction d'extrémités non homologues <sup>(14)</sup> (Figure 22).

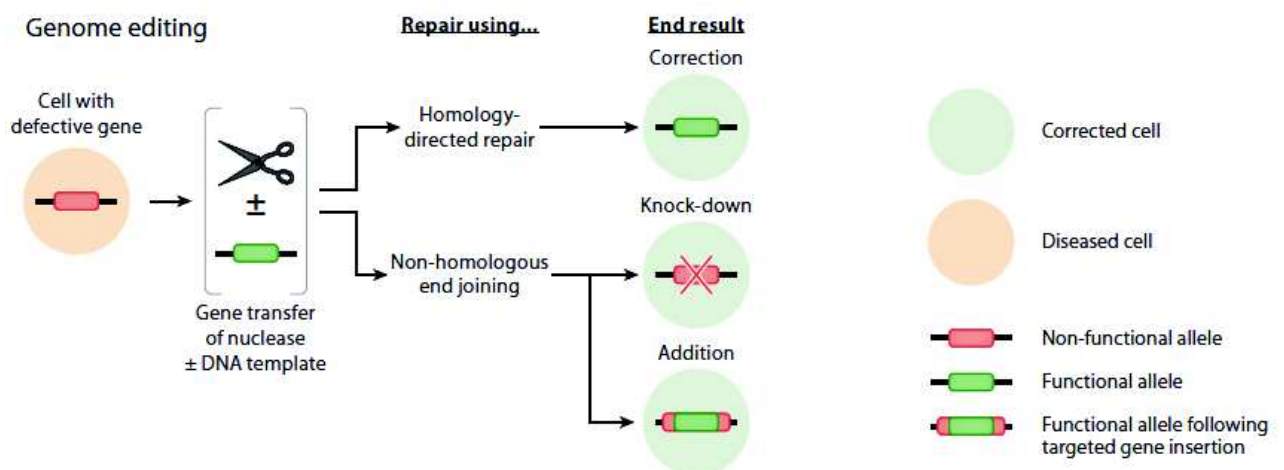


Figure 22 : Principe de l'édition génomique <sup>(14)</sup>

La jonction d'extrémités non homologues permet de relier les extrémités cassées et peut s'accompagner d'un gain ou d'une perte de quelques nucléotides selon un mécanisme d'insertion-délétion (*indel*), alors que la recombinaison homologue répare l'ADN en utilisant une séquence d'ADN « modèle » <sup>(14)</sup>. Ainsi, la mutation génétique peut être corrigée *in vivo* par l'apport d'une copie de l'allèle fonctionnel, remplaçant le gène muté par un gène sain qui sera sous le contrôle des signaux de régulation endogènes. L'expression d'un gène peut aussi être supprimée, par l'introduction de mutations provoquant un décalage du cadre de lecture au niveau du site de clivage de l'ADN.

### 2.5.1. Zinc Finger Nucleases

Les ZFN (*Zinc Finger Nucleases*) ont été développées suite à la compréhension, dans les années 1990, de la structure de l'enzyme de restriction FokI, naturellement présente chez la bactérie *Flavobacterium okeanokoites* <sup>(64)</sup>. Cette enzyme présente un domaine de liaison à l'ADN N-terminal et un domaine de clivage de l'ADN non spécifique au niveau C-terminal. Mimant cette structure, les ZFN sont des protéines synthétiques constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine à activité endonucléasique, séparés par un linker <sup>(65)</sup> (Figure 23). Le premier domaine est constitué de trois « doigts de zinc » (F1, F2 et F3 sur la Figure 23) qui se lient chacun à 3 nucléotides, conférant la spécificité du site d'action. L'activité de nucléase n'est possible que quand le domaine FokI est dimérisé ; ainsi les ZFN fonctionnent par paires, avec des domaines de liaison à l'ADN se liant à des régions voisines.

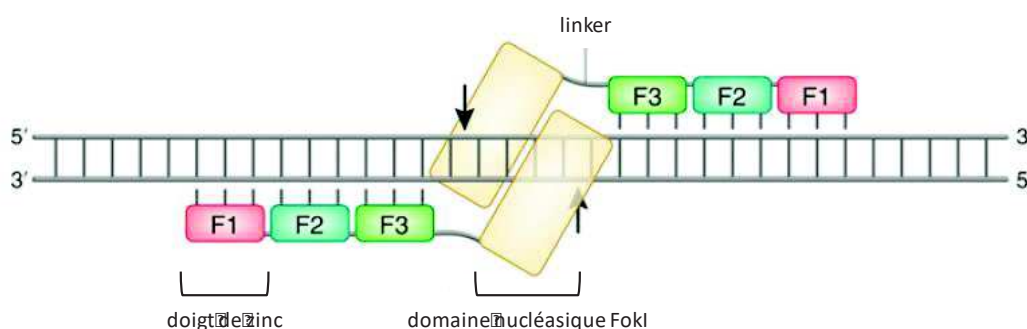


Figure 23 : Structure schématique d'une paire de Zinc Finger Nucleases <sup>(65)</sup>

L'activité *in vitro* des premières ZFN synthétiques a été démontrée par Kim *et al.* en 1996. Depuis, cette technologie a été utilisée pour des manipulations génétiques chez diverses espèces animales et végétales. Son application thérapeutique peut être illustrée par un essai clinique commencé en 2009, réalisé chez des patients infectés par le VIH-1 <sup>(66)</sup>. Le traitement consistait à prélever les précurseurs des lymphocytes T des patients, et à les modifier génétiquement grâce à un système de ZFN afin d'inactiver le gène CCR5, codant pour un corécepteur du virus VIH-1. Après expansion cellulaire, les lymphocytes T CD4 (obtenus à partir des précurseurs) ainsi modifiés étaient réadministrés aux patients. Si les résultats de cet essai sont plutôt prometteurs, la spécificité du domaine de liaison à l'ADN des ZFN reste un enjeu majeur pour permettre une utilisation sûre de cette technologie, qui présente des risques d'effets hors cible (*off-target*).

### 2.5.2. TALENs

Les TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) fonctionnent selon le même principe que les ZFN. Ce sont des protéines chimériques constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine à activité endonucléase, qui va provoquer une cassure double-brin au niveau du site

de liaison à l'ADN <sup>(67)</sup>. Ces protéines ont été développées suite à la découverte des TALE (*transcription activator-like effector*), des facteurs de transcription produits par les bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas*. Les TALE vont entrer dans le noyau de certaines espèces de plantes, et activer la transcription de gènes cibles végétaux. La région centrale des TALE est composée de répétitions d'un même motif constitué de 34 acides aminés (Figure 24). Chaque répétition du motif va se lier à un nucléotide cible unique. La reconnaissance site-spécifique se fait donc entre la partie protéique des TALE et l'ADN cible. La construction artificielle de TALEN, associant aux TALE une activité d'endonucléase (généralement FokI), permet la reconnaissance et le clivage de n'importe quelle séquence d'ADN génomique. De même que les ZFN, les TALENs fonctionnent par paire.

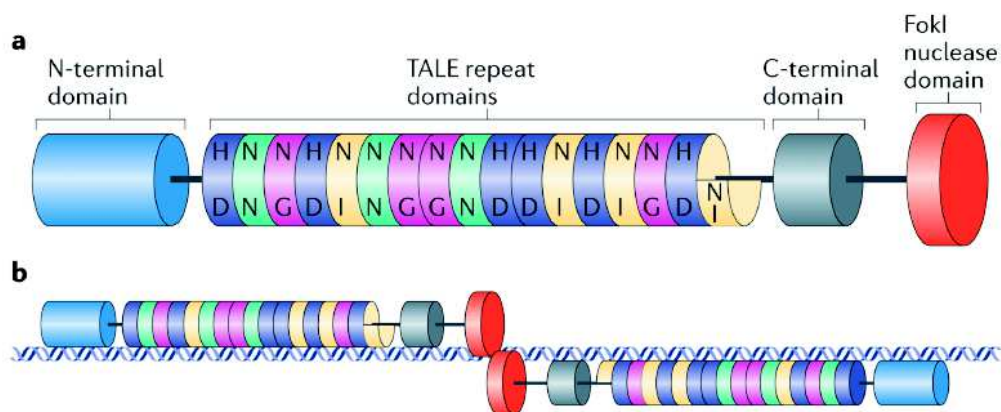


Figure 24 : Structure d'une TALEN unitaire (a) et d'une paire de TALENs (b) <sup>(68)</sup>

La première utilisation des TALENs a été rapportée en 2010 <sup>(69)</sup>, et cet outil est depuis largement utilisé dans le domaine de la recherche pour modifier génétiquement des espèces végétales et animales <sup>(68)</sup> et son potentiel thérapeutique ne fait aucun doute. En effet, des résultats prometteurs ont été obtenus dans le cadre d'un essai clinique mené sur des enfants atteints d'une forme avancée de leucémie <sup>(70)</sup>. Dans cet essai, les lymphocytes T des patients ont été modifiés génétiquement pour exprimer le récepteur universel CAR19 (qui reconnaît les cellules cancéreuses), et associés à une TALEN ciblant notamment le gène de la chaîne  $\alpha$  du TCR. La rémission moléculaire a été observée chez deux enfants, dans les 28 jours suivant l'injection du médicament.

Certains procédés font appel à une combinaison de différents outils décrits dans cette partie. C'est le cas par exemple des candidats UCAR T-cells développés par l'entreprise Cellectis <sup>(71)</sup>. Le procédé consiste à faire exprimer à des lymphocytes T un récepteur « universel » pouvant cibler certaines protéines présentes sur les cellules cancéreuses. Dans cette approche allogénique, des cellules T de donneurs sains sont modifiées génétiquement grâce à deux outils (Figure 25) :

- Le gène du récepteur T (initialement présent dans les cellules) est éliminé grâce à des TALENs qui vont spécifiquement cliver l'ADN au niveau du gène du TCR. Ces TALENs sont

amenées dans les cellules T par électroporation : les membranes des cellules sont rendues perméables temporairement sous l'action de pulses électriques. Le produit étant allogénique, cette étape permet d'éviter de déclencher une réponse immunitaire contre les cellules T modifiées lors de l'injection au patient.

- Une fois que le gène du TCR a été éliminé, un nouveau gène codant pour le récepteur UCAR est introduit dans les cellules T grâce à un vecteur lentiviral.

Les cellules T ainsi modifiées sont amplifiées en bioréacteurs, puis purifiées, réparties et congelées avant d'être administrée au patient.

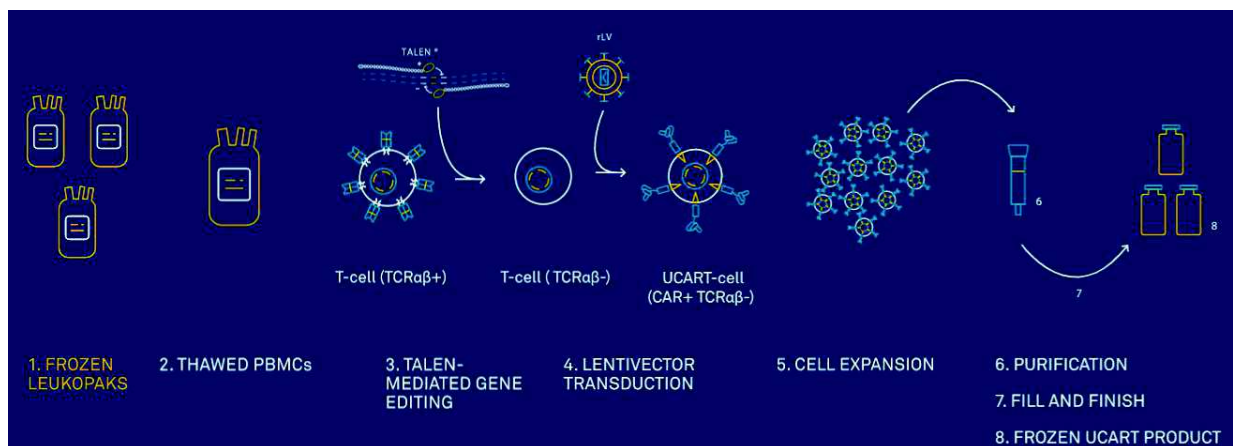


Figure 25 : Procédé de production des UCAR T-cells Collectis <sup>(71)</sup>

### 2.5.3. CRISPR/Cas9

Exposée pour la première fois en 2012 par E. Charpentier et J. Doudna <sup>(72)</sup>, la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 est en train de révolutionner le domaine de la biologie moléculaire. Elle est adaptée d'un mécanisme du système immunitaire des bactéries, décrit en 1987 chez la bactérie *E. Coli*. Lors d'une infection virale, les bactéries conservent dans leur génome un morceau de l'ADN viral, sous forme de séquences CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*). Ce sont des motifs répétés qui se trouvent à proximité des gènes Cas (*CRISPR-associated protein*), codant pour des endonucléases capables de cliver l'ADN. Ainsi, lors d'une nouvelle infection par le virus, les ARN issus des séquences CRISPR « archivées » dans le génome de la bactérie, lui serviront de guide pour reconnaître l'ADN viral étranger, et la protéine Cas9 viendra découper cet ADN viral, permettant à la bactérie de se débarrasser du virus. Ce système a été détourné pour fabriquer des outils d'édition génomique ciblant spécifiquement une région du génome. Le complexe CRISPR/Cas9 est constitué d'un ARN-guide, qui permettra la liaison site-spécifique du complexe, associé à l'endonucléase Cas9, qui clivera le double brin d'ADN au niveau du site de reconnaissance (Figure 26). L'ARN guide s'hybride à la séquence d'ADN génomique cible sur une vingtaine de nucléotides en amont d'une séquence PAM (*protospacer-associated motif*).

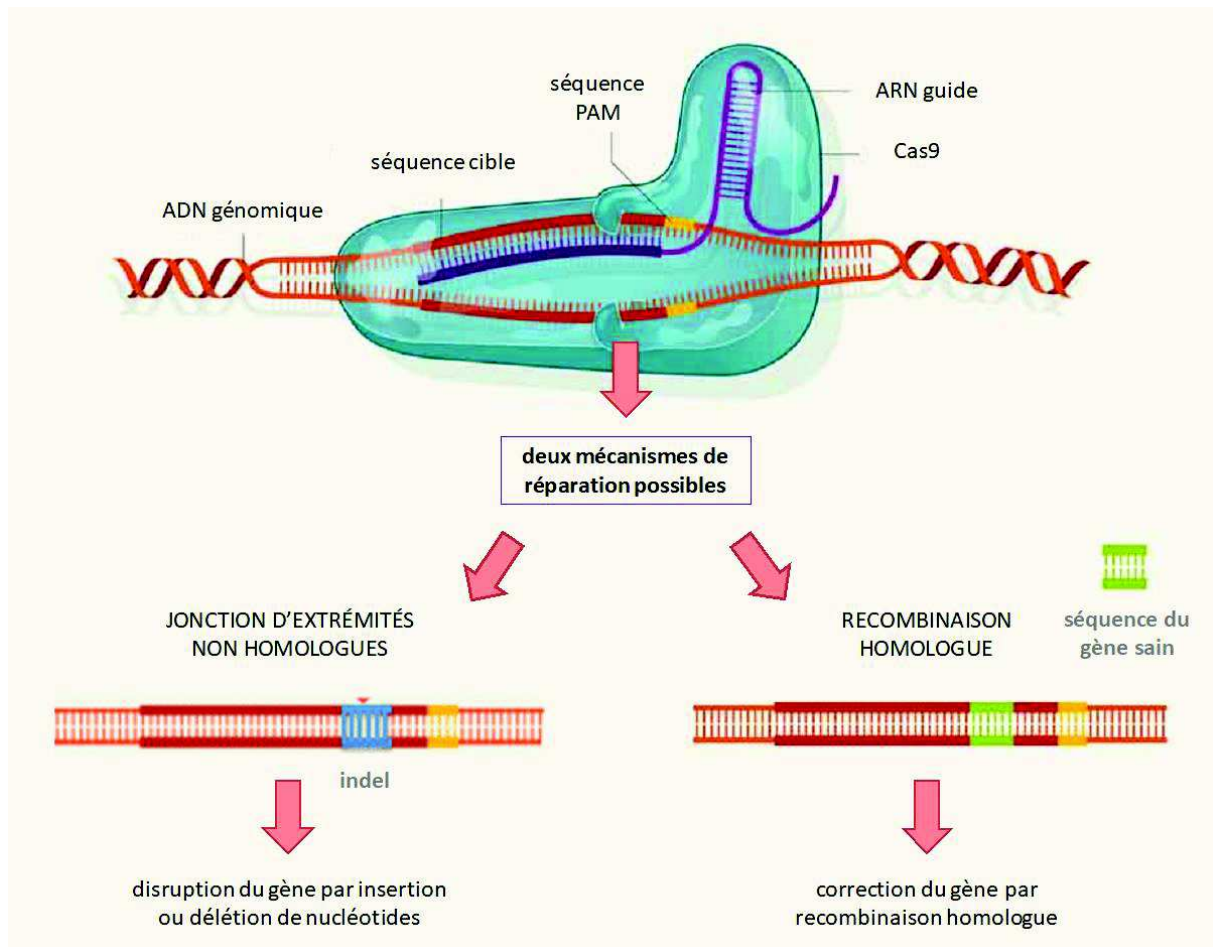


Figure 26 : Structure du système CRISPR/Cas9 et mécanismes de réparation associés <sup>(73)</sup>

Depuis leur développement, les CRISPR ont détrôné les ZFN et les TALEN : plus de 900 publications utilisant cette technologie sont parues depuis 2012 <sup>(74)</sup>, et le nombre de brevets déposés a explosé depuis 2014 <sup>(75)</sup>. Contrairement à l'ingénierie des nucléases, qui reste coûteuse et difficile, la fabrication d'un complexe CRISPR/Cas9 est simple et rapide. Son autre avantage par rapports aux systèmes ZFN et TALEN est une reconnaissance de la séquence cible basée sur une liaison ARN/ADN, et non plus protéine/ADN. Ce système permet donc la reconnaissance d'allèles spécifiques, et a montré une meilleure efficacité de réparation par jonction homologue que les nucléases. Malgré les avantages notables que présente la technique CRISPR/Cas9, le risque d'effet *off-target* est toujours présent. La première utilisation chez l'homme de cellules modifiées par cette technique a été réalisée dans le cadre d'un essai clinique de phase I en Chine, chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (à un stade avancé) en 2016 <sup>(76)</sup>. Cette étude a montré la sécurité d'utilisation de cellules T autologues génétiquement modifiées grâce à l'outil CRISPR/Cas9. Ces dernières années, l'engouement pour CRISPR/Cas9 ne cesse d'augmenter, car cet outil offre de vastes possibilités, tant en diagnostic qu'en thérapeutique.

Les trois outils d'édition du génome précédemment décrits utilisent des nucléases pour cliver l'ADN génomique au niveau de la séquence cible ; leurs caractéristiques principales sont résumées dans le Tableau 3.

	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
Structure	Protéique	Protéique	Protéique et acide nucléique
Etat enzymatique	Hétérodimère	Hétérodimère	Monomère
Domaine catalytique	FokI	FokI	Cas9/Cas9 modifiées
Spécificité de reconnaissance de la séquence cible	Protéine-ADN	Protéine-ADN	ARN-ADN
Taille	2x10,75kb	2x3kb	4kb
Durée de synthèse	4-6 mois	1-3 mois	2 semaines
Efficacité de recombinaison homologue	Jusqu'à 40%	Jusqu'à 50%	Jusqu'à 50%
Spécificité d'allèle	Non	Possible	Oui
Cytotoxicité et effets off-target	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Modéré à élevé

Tableau 3 : Caractéristiques principales des outils d'édition génomique utilisant des nucléases <sup>(77)</sup>

#### 2.5.4. Transposon « sleeping beauty »

Contrairement aux trois systèmes décrits ci-dessus qui utilisent des nucléases pour cliver la séquence d'ADN cible, le système de transposon « sleeping beauty » utilise une enzyme différente : la transposase. Un transposon est une séquence d'ADN qui peut changer de place dans le génome, sous l'action d'une transposase (nucléotidyltransférase). Celle-ci se lie aux extrémités du transposon et catalyse son déplacement vers une autre partie du génome, selon un mécanisme de « couper-coller » <sup>(78)</sup>. Le système de transposon « sleeping beauty », développé comme outil de biologie moléculaire, consiste en deux éléments : un transposon contenant une cassette d'expression, c'est-à-dire le gène d'intérêt sous forme de plasmide, et une source de transposase. Cette dernière peut être injectée directement en même temps que le plasmide (Figure 27), ou apportée sous forme d'un plasmide contenant le gène codant pour la transposase. L'enzyme va ainsi isoler le gène d'intérêt du plasmide transposon, puis le « coller » dans le génome hôte. Le gène d'intérêt ainsi « transposé » dans le génome peut être exprimé à long terme <sup>(79)</sup>.



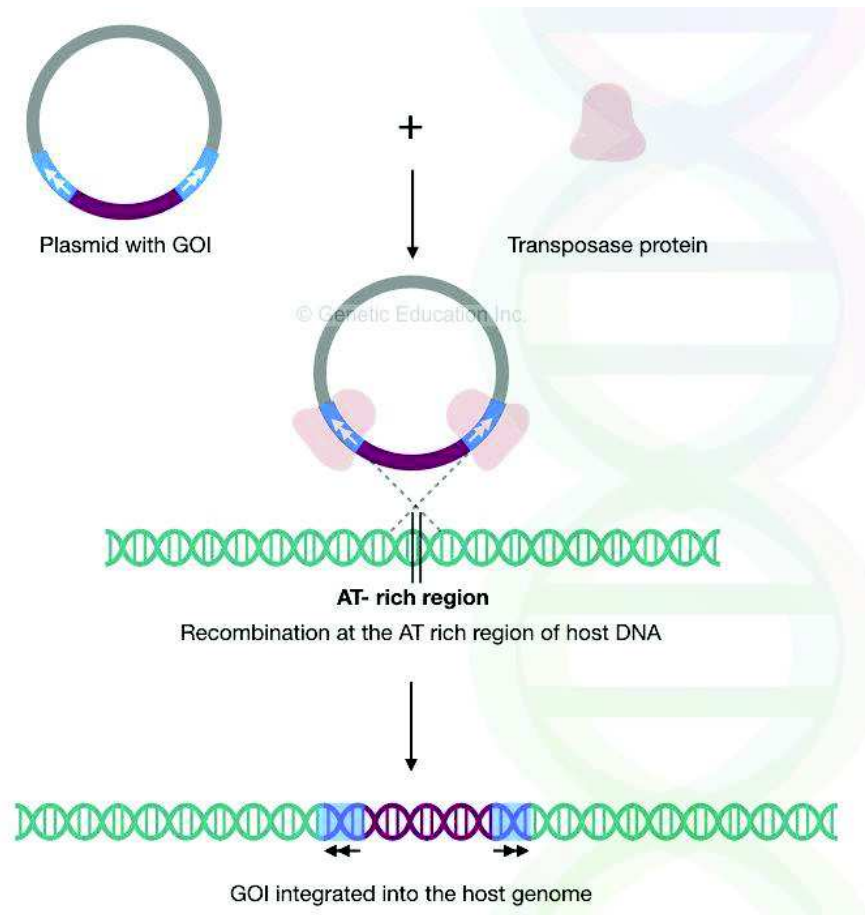


Figure 27 : Mécanisme d'action du transposon "sleeping beauty" <sup>(80)</sup>

Les preuves de concept ont été démontrées avec ce système pour le traitement de diverses maladies chez le rongeur, telles que l'hémophilie et la mucopolysaccharidose. L'utilisation de ce système pour la modification génétique de lymphocytes dans le but de générer des CAR T-cells est à l'étude <sup>(81)</sup>.

Grâce aux progrès réalisés dans la mise au point de systèmes de vectorisation de l'ADN et des outils d'édition du génome, le développement des médicaments de thérapie génique est passé de la recherche au développement préclinique puis aux essais cliniques afin d'être testés chez l'homme.

### 3. Etat des lieux : des premiers essais cliniques à la mise sur le marché de médicaments de thérapie génique

#### 3.1. Les débuts de la thérapie génique

Les progrès en biologie moléculaire concernant les outils d'édition du génome et l'amélioration des systèmes de vectorisation à partir des années 1970 ont mené à la réalisation des premiers essais de thérapie génique. La concrétisation des premiers essais cliniques de thérapie génique a eu lieu dans les années 1980, principalement pour le traitement de syndromes d'immunodéficience congénitaux ou héréditaires. Ainsi en 1995, une fillette de trois ans atteinte d'un déficit immunitaire combiné sévère par déficit en désaminase (ADA-SCID) a été traitée grâce à l'injection de cellules souches et de lymphocytes génétiquement modifiés <sup>(82)</sup>. Puis en 1999, un autre essai clinique mené par le professeur Alain Fischer de l'hôpital Necker marque le premier succès thérapeutique de thérapie génique, chez des « bébés-bulles » <sup>(83)</sup> (**Figure 28**). Ces enfants, atteints de déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X), ont une espérance de vie inférieure à un an en l'absence de greffe de moelle osseuse allogénique <sup>(84)</sup>. Ils étaient donc contraints à vivre dans des enceintes confinées sous atmosphère stérile, leur système immunitaire étant incapable de combattre les antigènes présents dans l'environnement extérieur à ces bulles.



*Figure 28 : Le Professeur Alain Fischer (Unité Inserm 768 "Développement normal et pathologique du système immunitaire") portant un bébé-bulle <sup>(85)</sup>*

A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo et S. Hacein-Bey-Abina (faisant partie à l'époque de l'Unité Inserm 768, "Développement normal et pathologique du système immunitaire", Département de Biothérapies et Unité d'Immunologie et d'Hématologie pédiatrique, Hôpital Necker Enfants

Malades AP-HP, Université Paris Descartes, Paris) proposent alors un nouveau traitement qui permet de s'affranchir des inconvénients liés à la greffe de moelle osseuse. Ce traitement consiste à insérer une copie normale du gène altéré dans l'organisme des enfants malades. Dix patients ont ainsi été traités par transfert *ex vivo* du gène thérapeutique au niveau des cellules souches CD34<sup>+</sup> à l'aide d'un vecteur rétroviral de souris <sup>(86)</sup>. Une fois génétiquement modifiées, ces cellules ont été réinjectées aux bébés par voie sanguine. Une restauration stable du déficit immunitaire a été obtenue chez huit patients.

Cependant, des complications sévères sont survenues chez quatre des bébés traités : ces derniers ont développé des leucémies <sup>(34)</sup> et un des patients est décédé de cet effet secondaire grave, dû à une insertion du gène thérapeutique dans le génome insuffisamment maîtrisée.

### 3.2. Les complications potentielles et stratégies pour minimiser ces risques

Suite à l'essai clinique SCID-X du professeur A. Fischer, des évènements indésirables graves ont été rapportés dans d'autres essais cliniques utilisant des vecteurs viraux intégratifs, tels que le développement de leucémies aiguës lymphoïdes chez des patients participant à des essais cliniques dans le syndrome de Wiskott-Aldrich ou la granulomatose sceptique chronique <sup>(32)</sup>. Ces essais ont été réalisés avec les premières générations de vecteurs rétroviraux. Dans les régions LTR se trouve une séquence *enhancer*, capable d'agir sur des gènes à distance et d'induire leur transcription. Dans tous les cas reportés, l'insertion du gène thérapeutique avait eu lieu à proximité de proto-oncogènes, des gènes dont l'expression favorise la survenue de cancers. L'insertion du transgène et de la séquence *enhancer* à proximité de ces proto-oncogènes a activé leur expression, menant après quelques années au développement de cancers (notamment des leucémies). Ces évènements ont mis en évidence un des risques majeurs liés à l'utilisation de vecteurs viraux intégratifs : le risque de mutagénèse insertionnelle.

L'intégration du transgène dans le génome est sous la dépendance de l'architecture du vecteur utilisé (promoteurs, séquences régulatrices...). Lors de l'intégration du transgène dans le génome, différents cas peuvent être envisagés <sup>(32)</sup> : l'intégration peut rester silencieuse et dans ce cas n'interfère pas avec le génome de la cellule hôte ; ou alors l'intégration peut interférer sur l'activité transcriptionnelle de la cellule, soit sans conséquence notable, soit menant à une transformation bénigne ou maligne des cellules. Ainsi depuis 2003, afin d'évaluer les risques de mutagénèse insertionnelle, les instances réglementaires demandent aux laboratoires et entreprises développant des médicaments de thérapie génique de rechercher l'évènement d'intégration et de séquencer les régions voisines des sites d'intégrations. Selon l'EMA, plusieurs facteurs peuvent contribuer au risque d'oncogénèse : l'architecture du vecteur et notamment les éléments régulateurs, le profil d'insertion (mise en évidence de sites d'intégration préférentiels), la dose de vecteur, le produit résultant de l'expression du transgène, et enfin les cellules/organes cibles.

Pour réduire le risque de mutagenèse insertionnelle, différentes stratégies de contrôle d'intégration peuvent être envisagées. Tout d'abord, l'amélioration des constructions génétiques portant le gène thérapeutique a permis de diminuer les risques liés à l'insertion du transgène dans le génome, par exemple avec le développement des vecteurs SIN (*self-inactivating*), dans lesquels la séquence enhancer est supprimée <sup>(35)</sup>. L'ajout dans les constructions génétiques de séquences insulatrices et le choix d'un promoteur approprié sont d'autres solutions permettant d'améliorer la sécurité d'utilisation des vecteurs intégratifs. Ensuite, la mise au point de vecteurs hybrides pourrait également augmenter la sécurisation de l'intégration : des vecteurs hybrides transposon-adénovirus ont été développés <sup>(87)</sup>, ou encore des vecteurs non viraux fusionnés à un domaine protéique de liaison à l'ADN, toujours dans le but d'augmenter la spécificité de liaison à l'ADN génomique et de sécuriser le site d'intégration. Enfin, l'utilisation d'outils d'édition du génome, comme CRISPR/Cas9, permettrait d'augmenter la spécificité d'insertion du gène thérapeutique, avec toutefois un risque résiduel d'effets *off-target*.

Ainsi, de nombreux travaux de recherche et essais cliniques testent différentes stratégies visant à réduire au maximum le risque principal associé aux vecteurs intégratifs qu'est la mutagenèse insertionnelle.

### 3.3. Les essais cliniques

Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire et de production, et suite aux résultats encourageants des premiers essais cliniques de thérapie génique (risque d'insertion aléatoire mis à part), le nombre d'essais cliniques a explosé dans les années 2000 et poursuit une tendance à la hausse depuis (Figure 29).

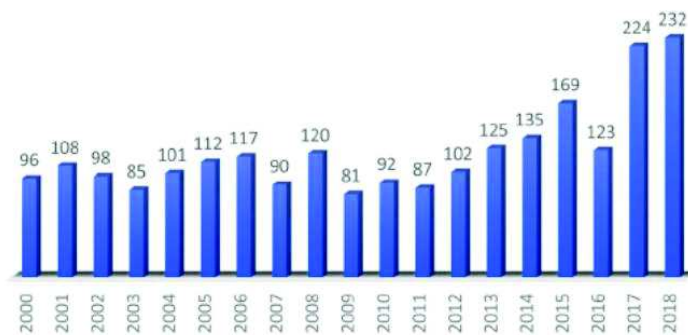
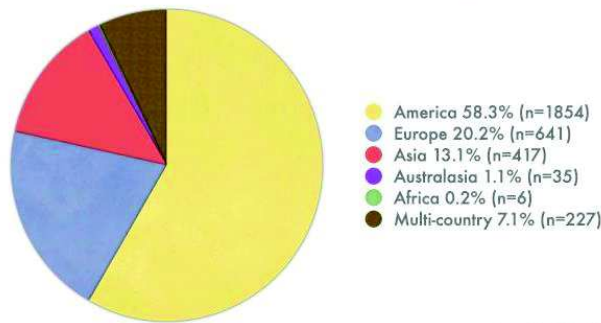


Figure 29 : Nombre d'essais cliniques de thérapie génique par an au niveau international (2000-2018) <sup>(88)</sup>

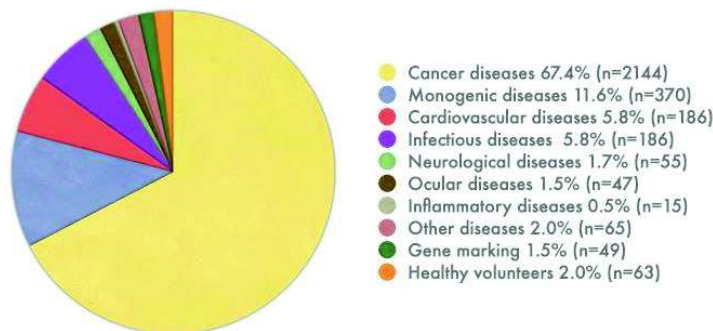
En 2017, environ 2600 essais cliniques ont été menés, sont actuellement en cours ou ont été approuvés par les autorités compétentes <sup>(89)</sup>. L'état des lieux en 2021 montre que les essais ont été ou sont conduits sur tous les continents, avec une prédominance pour l'Amérique qui concentre environ 58% des essais aux USA, suivie par l'Europe pour environ 20% des essais (Royaume-Uni, Allemagne et France principalement) (Figure 30).

### Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials By Continent



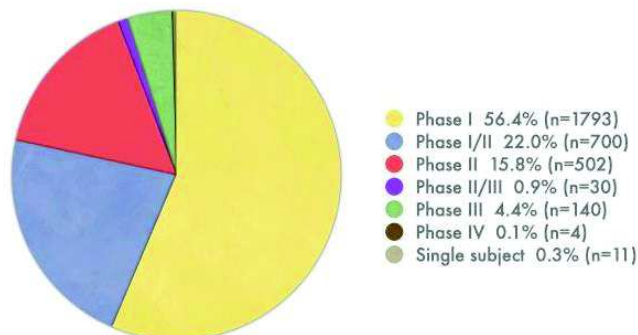
Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

### Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials



Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

### Clinical Phases of Gene Therapy Clinical Trials



Copyright © 2021 by John Wileys and Sons LTD

Figure 30 : Distribution géographique, indications et phases des essais cliniques de thérapie génique en cours <sup>(90)</sup>

Les aires thérapeutiques concernées par les essais cliniques de thérapie génique sont majoritairement les cancers (67% des essais) et les maladies monogéniques héréditaires (11%), suivis par les maladies infectieuses (6%) et les maladies cardiovasculaires (6%) (Figure 30). Différents cancers sont ciblés : poumons, peau, cancers gynécologiques, neurologiques, tumeurs gastro-intestinales... L'utilisation de CAR-T cells dans des essais cliniques visant à traiter des cancers du sang (leucémies) a augmenté drastiquement et les essais montrent des résultats très prometteurs. Les stratégies utilisant des virus oncolytiques ont également montré leurs preuves (les médicaments disponibles sur le marché seront décrits par la suite). Concernant les maladies monogéniques, environ 16% des essais ciblent des déficits immunitaires primaires. La diversité

des maladies monogéniques est telle qu'actuellement, une quarantaine de ces maladies fait l'objet d'essais cliniques de thérapie génique (mucoviscidose, thalassémies, drépanocytose, amyotrophie spinale ou encore myopathie de Duchenne pour n'en citer que quelques-unes).

Plus des trois quarts des essais cliniques de thérapie génique sont en phase I ou phase I/II (environ 78%) ; les essais en phase II représentent 16%, et moins de 5% des essais sont en phase III (Figure 30). Il est à noter que la proportion d'essais en phase II ou III augmente au cours du temps (15% en 2004 à 21% en 2021), illustrant les progrès réalisés dans le développement des médicaments de thérapie génique.

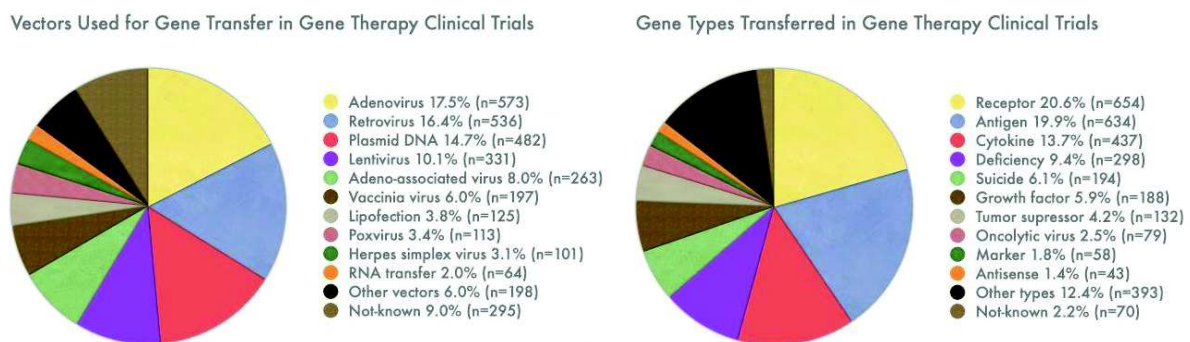


Figure 31 : Répartition des vecteurs utilisés en essais cliniques et types de transgènes <sup>(90)</sup> <sup>(89)</sup>

Différents types de vecteurs sont utilisés en essais cliniques, les vecteurs viraux représentant l'approche la plus utilisée : les vecteurs adénoviraux et rétroviraux représentent à eux deux environ 34% des essais (Figure 31). Le nombre d'essais mettant en œuvre des vecteurs rétroviraux a diminué, passant de 28% en 2004 à 16% en 2017, car le profil d'intégration plus sûr des lentivecteurs est privilégié. Parallèlement, le nombre d'essais cliniques utilisant des AAV et des lentivirus a augmenté respectivement de 4,8 points et 5,5 points en 9 ans (de 2012 à 2021). Dans la catégorie des vecteurs non viraux, c'est la technique de l'injection d'ADN nu qui est la plus utilisée (environ 15% des essais cliniques en 2021). Les méthodes physiques restent peu utilisées en clinique.

De nombreux types de transgènes peuvent être transférés, en fonction de l'indication thérapeutique choisie (Figure 31). Logiquement, les types de gènes les plus fréquemment utilisés sont ceux permettant de combattre le cancer (antigènes, cytokines, suppresseurs de tumeurs, gènes suicides). Ces catégories comptent pour environ 44% des essais. Les gènes codants pour des récepteurs représentent 20,6% des essais et sont principalement utilisés dans le traitement des cancers (thérapies CAR-T notamment). La catégorie « Deficiency » sur la Figure 31 désigne les gènes thérapeutiques utilisés dans le traitement des maladies monogéniques et représente 9,4% des essais. Les facteurs de croissance comptent pour 5,9% des essais, notamment ceux ciblant des pathologies cardiovasculaires.

Ainsi, la thérapie génique offre de vastes applications possibles dans de nombreuses indications, et les instances réglementaires s'attendent à un nombre toujours croissant d'essais cliniques dans les années à venir.

### 3.4. Les médicaments sur le marché

Si le nombre d'essais cliniques mettant en jeu des médicaments de thérapie génique a connu une augmentation importante depuis les années 2000, l'accès au marché de tels médicaments reste complexe et de nombreux obstacles doivent encore être surmontés. En 2020, 9 médicaments de thérapie génique ont été autorisés et ont pu accéder au marché. Bien que les principales instances réglementaires autorisant la mise sur le marché des médicaments de thérapie génique soient la FDA (*Food and Drug Administration*) et l'EMA (*European Medicine Agency*), le premier médicament de thérapie génique a été approuvé en 2003 en Chine. Les principales caractéristiques des médicaments de thérapie génique sur le marché en 2020 (EMA & FDA) sont résumées dans le [Tableau 4](#).

Glybera® fut le premier médicament de thérapie génique approuvé dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis en 2012, indiqué en cas de déficit familial en lipoprotéine lipase <sup>(91)</sup>. Ce médicament, développé par la société néerlandaise UniQure, a été retiré du marché en 2017 par l'EMA par manque de rentabilité après une seule vente commerciale ; en effet, le médicament était rapidement devenu le plus cher du monde avec un prix avoisinant le million de dollars. Deux ans après son retrait du marché, le Glybera® pourrait bénéficier d'un second souffle : il a été choisi pour faire partie d'un nouveau programme fédéral canadien visant à développer des versions abordables de médicaments de thérapie génique <sup>(92)</sup>. En effet, le Canada est la région du monde qui compte le plus de personnes atteintes de la maladie génétique rare qu'est le déficit familial en lipoprotéine lipase.

En 2015, la première thérapie utilisant un virus oncolytique commercialisée par Amgen, Imlygic®, a été approuvée par la FDA dans le traitement du mélanome <sup>(93)</sup>. C'est un virus HSV-1 atténué portant la séquence codant le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), administré *in vivo* ; le virus va se répliquer dans la tumeur et entraîner la production de GM-CSF qui va stimuler les réponses immunitaires du patient et notamment une réponse antitumorale par les lymphocytes T cytotoxiques.

Le Strimvelis® commercialisé par GSK a obtenu son AMM en 2016 et représente le premier médicament de thérapie génique *ex vivo* sur le marché européen. Il est indiqué dans le traitement des ADA-SCID, un déficit immunitaire grave lié à un déficit en adénosine-désaminase et consiste à modifier génétiquement les cellules souches hématopoïétiques du patient grâce à un vecteur rétroviral portant le gène codant pour l'adénosine-désaminase <sup>(94)</sup>. Le produit réinjecté au patient

est donc constitué de la « fraction cellulaire autologue enrichie en CD34<sup>+</sup> contenant des cellules CD34<sup>+</sup> transduites avec un vecteur rétroviral codant la séquence d'ADNc du gène ADA humain ». En 2017, les deux premières thérapies à base de CAR-T cells ont obtenu leur AMM auprès de la FDA. Kymriah®, développé par le Children's Hospital of Philadelphia et l'industrie pharmaceutique Novartis, a été autorisé à la commercialisation après la rémission du premier patient pédiatrique traité en 2012. Ce médicament, indiqué dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique B, consiste à modifier ex vivo les lymphocytes T du patient pour leur faire exprimer un récepteur chimérique de la protéine CD19, présente sur les lymphocytes B tumoraux<sup>(27)</sup>. La réinjection intraveineuse des lymphocytes T génétiquement modifiés entraîne l'apoptose de ces cellules. Peu de temps après, Yescarta® commercialisé par Kite Pharma (racheté par Gilead) a reçu l'AMM pour le traitement de troisième ligne ou plus du lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) ou du lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B (LMPGCB) réfractaire ou en rechute<sup>(28)</sup>. Il est basé sur le même mécanisme d'action que Kymriah®.

En 2017 également, Luxturna® a obtenu aux Etats-Unis l'AMM 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<sup>(95)</sup>. L'injection sous-rétinienne du médicament permet une amélioration significative de la vision des patients traités. C'est le premier traitement proposé dans cette maladie orpheline, autorisé en France depuis avril 2019.

En 2019, deux médicaments de thérapie génique ont fait leur arrivée sur le marché : Zolgensma® indiqué dans le traitement de l'amyotrophie spinale aux Etats-Unis et en Europe<sup>(96)</sup>, à ce jour médicament le plus cher du monde, et Zynteglo® approuvé en Europe dans le traitement de la  $\beta$ -thalassémie. L'amyotrophie spinale est une maladie génétique touchant les motoneurones, qui se manifeste par une faiblesse musculaire de gravité variable. La forme la plus fréquente de la maladie est liée à une anomalie au niveau du gène SMN1, codant pour la protéine de survie des motoneurones (*Survival of Motor Neuron*). Le médicament, visant à apporter une copie fonctionnelle du gène SMN1, a montré des effets positifs sur le développement moteur des enfants traités. Si le prix du traitement a suscité une polémique, ses effets bénéfiques ont été confirmés par les retours de quatre essais cliniques différents, et le médicament a obtenu l'autorisation de mise sur le marché au Japon en mars 2020<sup>(97)</sup>.



Nom de marque	Indication	Année d'obtention d'AMM	Instance réglementaire	Fabricant	Vecteur utilisé	Transgène	Stratégie	Coût	Stratégie thérapeutique
Imlygic	Mélanome	2015	FDA (USA) EMA (UE)	Amgen (USA)	HSV1 modifié	GM-CSF	In-vivo	65 K \$	Virus oncolytique
Strimvelis	ADA-SCID	2016	EMA (UE)	GlaxoSmithKline (Royaume Uni)	Vecteur gamma-rétroviral	Adénosine désaminase	Ex-vivo	700 K \$	Gene augmentation
Kymriah	Leucémie lymphoblastique aigüe	2017	FDA (USA)	Novartis Pharmaceuticals (Suisse)	Lentivecteur	Récepteur CAR anti-CD19	Ex-vivo	350 K à 475 K \$	CAR-T : expression d'un récepteur chimérique universel CD19
Yescarta	Lymphome à cellules B	2017	FDA (USA)	Kite Pharma / Gilead (USA)	Vecteur gamma-rétroviral	Récepteur CAR anti-CD19	Ex-vivo	373 K \$	CAR-T : expression d'un récepteur chimérique universel CD19
Luxturna	Dystrophie rétinienne (mutation bi-allélique RPE65)	2017	FDA (USA)	Spark Therapeutics, Inc. (USA)	AAV2	RPE65	In-vivo	850 K \$	Gene augmentation : apport de la copie saine du gène RPE65 muté
Zolgensma	Amyotrophie spinale (pédiatrique)	2019	FDA (USA)	Novartis AveXis (USA)	AAV9	SMN1	In-vivo	2,125 M \$	Gene augmentation
Zynteglo	B-thalassémie	2019	EMA (UE)	BlueBird Bio (Pays-Bas)	Lentivecteur	B-globine	Ex-vivo	1,7 M \$	Gene augmentation
Tecartus	Lymphome à cellules du manteau réfractaire ou en rechute	2020*	EMA (UE)	Kite Pharma / Gilead (USA)	Vecteur rétroviral	Récepteur CAR anti-CD19	Ex-vivo	373 K \$	CAR-T : expression d'un récepteur chimérique universel CD19
Libmeldy	Leucodystrophie métagénétique	2020	EMA (UE)	Orchard Therapeutics (UK)	Lentivecteur	ARSA (human arylsulfatase A)	Ex-vivo	?	Gene augmentation

\*AMM conditionnelle

Tableau 4 : Caractéristiques des médicaments de thérapie génique sur le marché européen (EMA) et américain (FDA) (liste mise à jour en mars 2021)

En 2019 également, Zynteglo® développé par Bluebird Bio a obtenu l'AMM dans le traitement de la  $\beta$ -thalassémie en Europe <sup>(98)</sup>. Le traitement consiste à réinjecter au patient des cellules autologues enrichies en cellules CD34<sup>+</sup> codant le gène  $\beta$ A-T87Q-globine. La plupart des patients traités n'ont plus besoin de transfusions sanguines pour augmenter leurs niveaux de globules rouges fonctionnels.

En 2020, deux médicaments de thérapie génique ont reçu leur autorisation de mise sur le marché auprès de l'EMA : Tecartus® de Kite/Gilead et Libmeldy® d'Orchard Therapeutics.

Le Tecartus®, ayant reçu fin 2020 une AMM conditionnelle de la part de l'EMA, est la première thérapie CAR-T à être utilisée dans le traitement des formes réfractaires ou en rechute de lymphome à cellules du manteau, une forme rare de lymphome non hodgkinien qui dérive des cellules de la « zone du manteau » du ganglion lymphatique <sup>(99)</sup>. Cette thérapie autologue consiste à modifier génétiquement les cellules T du patient à l'aide d'un vecteur lentiviral permettant aux cellules T d'exprimer un récepteur CAR anti-CD19.

Libmeldy® a été approuvé pour le traitement de la leucodystrophie métachromatique d'apparition précoce, une maladie caractérisée par des mutations bi-alléliques dans le gène ARSA (arylsulfatase A) entraînant des dommages neurologiques et une régression du développement chez l'enfant <sup>(100)</sup>. Les cellules souches hématopoïétiques autologues sont sélectionnées et leur génome est modifié grâce à un vecteur lentiviral, puis les cellules modifiées sont réinjectées au patient et vont migrer à travers la barrière hémato-encéphalique dans le cerveau et vont pouvoir exprimer l'enzyme fonctionnelle.

Avec un nombre croissant d'essais cliniques et de médicaments accédant au marché, le développement de la thérapie génique continue à prendre de l'ampleur, permettant aux patients atteints de maladies génétiques rares de bénéficier de traitements durables pour des maladies auparavant incurables. Les autorités de santé s'attendent dans les prochaines années à une augmentation importante du nombre de dossiers de soumission pour l'accès au marché de tels médicaments. A titre d'exemple, la FDA s'attendait à recevoir plus de 200 dossiers par an jusqu'en 2020 <sup>(101)</sup>. La recherche et le développement de ces nouveaux médicaments issus du vivant sont soutenus par la Commission européenne au travers de programmes tels que Health, Horizon 2020. Ainsi, cette stratégie prometteuse a pu atteindre un degré de maturité permettant son industrialisation et par voie de conséquence, la guérison de maladies auparavant incurables. La thérapie génique soulève toutefois des questions éthiques et de sécurité à long terme, et doit encore surmonter des obstacles réglementaires et industriels conséquents.

## II. Cadre réglementaire de la production des médicaments de thérapie génique

### 1. Définition réglementaire du médicament de thérapie génique

L'apparition dans les années 1990 de nouveaux produits de thérapie génique et de thérapie cellulaire a engendré la création d'une nouvelle classe spécifique de médicaments. En effet, jusqu'au début des années 2000 ces nouveaux produits n'étaient pas pris en compte dans la réglementation européenne. En 2001, le cadre réglementaire relatif aux médicaments à usage humain a été instauré via la Directive 2001/83/EC <sup>(102)</sup>. En 2003, la Commission Européenne propose une définition pour les produits de thérapie génique et de thérapie cellulaire. Par la Directive 2003/63/EC <sup>(103)</sup> modifiant la Directive 2001/83/EC <sup>(102)</sup>, elle classe ces nouveaux produits parmi les « *medicinal products* » (médicaments), et crée une nouvelle classe de « médicaments de thérapie innovante » ou MTI, appelés « *advanced therapy medicinal products* » en anglais (ATMP). Ainsi, à partir de la définition générale du médicament intégrée dans l'article L5111-1 du Code de la Santé Publique, de nouvelles définitions ont été élaborées et intégrées aux textes réglementaires, au fur et à mesure de l'émergence de nouvelles classes de médicaments.

#### 1.1. Médicament biologique

Les médicaments de thérapie génique sont des médicaments biologiques, définis dans la Directive 2003/63/EC <sup>(103)</sup> modifiant la Directive 2001/83/EC <sup>(102)</sup>, comme des produits « dont la substance active est une substance biologique ». Une substance biologique est une substance qui est « produite à partir d'une source biologique ou en est extraite, et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle ».

#### 1.2. Médicament de biotechnologie

Les médicaments de thérapie génique sont également considérés comme des médicaments de biotechnologie. La définition de ces médicaments a été établie dans le règlement n°2309/93 <sup>(104)</sup>, dont le but était d'instaurer des procédures encadrant « l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire ». Selon ce règlement, les médicaments de biotechnologie désignent « tout produit dont le développement ou la production fait appel aux procédés suivants : technologie de l'ADN recombinant, expression contrôlée de gènes codant pour des protéines biologiquement actives, dans des cellules procaryotes ou des

eucaryotes, y compris des cellules transformées de mammifères ; méthodes à base d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux ».

### 1.3. Médicament de thérapie innovante

La définition des médicaments de thérapie innovante a été établie dans la partie IV de l'Annexe I de la Directive 2001/83/EC <sup>(102)</sup> modifiée par la Directive 2003/63/EC <sup>(103)</sup>. Contrairement aux médicaments classiques dont l'activité thérapeutique est portée par une substance d'origine chimique ou biologique, les médicaments de thérapie innovante sont basés sur l'utilisation de composants du vivant que sont les gènes, les cellules ou les tissus. La Directive 2003/63/EC <sup>(103)</sup> précise que les médicaments de thérapie innovante « se fondent sur des procédés de fabrication axés sur différentes biomolécules produites par transfert de gènes, et/ou sur des cellules dont les propriétés biologiques ont été modifiées et qui sont utilisées comme substances actives ou parties de substances actives ». Ces médicaments de thérapie innovante comprennent 4 classes <sup>(105)</sup> : les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les produits issus de l'ingénierie tissulaire, et pour finir les médicaments combinés de thérapie innovante.

### 1.4. Médicament de thérapie génique

La définition des médicaments de thérapie génique (MTG) a été actualisée par la Directive 2009/120/EC <sup>(106)</sup>, modifiant la partie IV de l'annexe 1 de la Directive 2001/83/EC <sup>(102)</sup>. Par médicament de thérapie génique, on entend un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes :

- « a) il contient une substance active qui 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 ;
- b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence. »

Ces deux conditions doivent être remplies pour que le produit rentre dans la catégorie de médicament de thérapie génique. Dans un souci de renforcement et d'harmonisation de la réglementation des médicaments de thérapie génique (et plus généralement des MTI) au niveau européen, le règlement CE n°1394/2007 du Parlement européen et du Conseil <sup>(105)</sup> a été adopté et est entré en vigueur le 30 décembre 2008. Les principaux textes réglementaires applicables aux médicaments de thérapie génique sont regroupés dans le Tableau 5.

Référence du texte réglementaire	Périmètre du texte réglementaire
Directive 2000/38/CE de la Commission du 5 juin 2000 modifiant le chapitre V bis (Pharmacovigilance) de la directive 75/319/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives aux spécialités pharmaceutiques	Modifie le chapitre V bis de la directive 75/319/CEE relatif aux systèmes de pharmacovigilance, afin de les adapter aux progrès scientifiques et techniques
Règlement (CE) n°141/2000 du Parlement européen et du Conseil, du 16 décembre 1999, concernant les médicaments orphelins	Définition du statut de médicament orphelin pour le traitement, la prévention ou le diagnostic de maladies rares
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	Dispositions applicables à la dissémination volontaire dans l'environnement d'organisme(s) génétiquement modifié(s)
Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil, du 6 novembre 2001, instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain	Cadre réglementaire des médicaments à usage humain
Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE	Etablit des normes de qualité et de sécurité pour le sang humain et les composants sanguins afin d'assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine
Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil	Amendement de la directive 2001/83/CE avec ajout de la partie IV à l'Annexe I Définition des produits de thérapie cellulaire somatique et produits de thérapie génique, et informations contenues dans le dossier d'AMM d'un MTI
Règlement (CE) n°726/2004 du Parlement européen et du Conseil, du 31 mars 2004, établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une Agence européenne des médicaments	Enregistrement réglementaire des MTI selon la procédure centralisée
Directive 2004/23/CE applicable aux produits à base de cellules ou tissus du Parlement européen et du Conseil, du 31 mars 2004, relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules d'origine humaine	Dispositions applicables à la manipulation des tissus et cellules d'origine humaine du don à la distribution

Référence du texte réglementaire	Périmètre du texte réglementaire
Directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 modifiant la Directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain	Etablit un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain
Directive 2005/28/CE de la Commission du 8 avril 2005 fixant des principes et des lignes directrices détaillées relatifs à l'application de bonnes pratiques cliniques en ce qui concerne les médicaments expérimentaux à usage humain, ainsi que les exigences pour l'octroi de l'autorisation de fabriquer ou d'importer ces médicaments	Etablit les principes des bonnes pratiques cliniques et les exigences pour l'octroi de l'autorisation de fabriquer ou d'importer les médicaments expérimentaux à usage humain
Directive 2005/61/CE du 30 septembre 2005 portant application de la directive n°2002-98 du Parlement Européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences en matière de traçabilité et la notification des réactions et incidents indésirables graves	Définit les exigences en matière de traçabilité et la notification des réactions et incidents indésirables graves
Directive 2006/17/CE de la Commission, du 8 février 2006, portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au don, à l'obtention et au contrôle de tissus et de cellules d'origine humaine	Dispositions applicables à la manipulation des tissus et cellules d'origine humaine du don à la distribution
Règlement (CE) n°1394/2007 du Parlement européen et du Conseil, du 13 novembre 2007, concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE et le règlement (CE) n°726/2004	Définition des MTI, du cadre réglementaire et mesures incitatives applicables
Directive 2009/120/CE de la Commission, du 14 septembre 2009, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les médicaments de thérapie innovante	Modification de la partie IV à l'Annexe I de la directive 2001/83/CE
Directive 2010/84/UE du Parlement Européen et du Conseil du 15 décembre 2010 modifiant, en ce qui concerne la pharmacovigilance, la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain	Modification de la directive 2001/83/CE concernant la pharmacovigilance

Référence du texte réglementaire	Périmètre du texte réglementaire
Pharmacopée européenne 10 <sup>ème</sup> édition (applicable en Europe à partir du 1 <sup>er</sup> janvier 2021)	Normes de contrôle qualité harmonisées
Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (version du 6 mai 2019)	Nouvelle partie IV spécifique aux médicaments de thérapies innovantes (MTI) Nouvelle version de l'annexe 2 relative à la fabrication des substances actives biologiques et des médicaments à usage humain.

*Tableau 5 : Principaux textes réglementaires applicables aux médicaments de thérapie génique en Europe*

## 2. Textes réglementaires opposables

### 2.1. Règlementation OGM

Les médicaments de thérapie génique, de par leur nature et leur procédé de production utilisant de l'ADN à des fins thérapeutiques, sont considérés comme étant des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). La modification génétique d'organismes (qui peuvent être par exemple des plantes, des bactéries ou des cellules) repose sur l'utilisation de techniques de génie génétique, décrites dans la première partie de cette thèse. Ces techniques permettent d'ajouter, de modifier ou de supprimer un ou plusieurs gènes, conférant ainsi à l'OGM une nouvelle caractéristique.

Dans l'Union Européenne, l'utilisation des OGM est encadrée par la directive 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement <sup>(107)</sup>, mise en place en mars 2001. Elle donne la définition juridique d'un OGM, qui est la suivante : « 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 ». Cette modification génétique peut notamment être réalisée selon la technique de recombinaison d'ADN par insertion de molécules d'acide nucléique dans un organisme hôte. Ainsi, les médicaments de thérapie génique répondent à la définition d'OGM.

#### 2.1.1. Demande d'agrément OGM

La réglementation européenne, de par les directives 2001/18/CE <sup>(107)</sup> et 2009/41/CE <sup>(108)</sup>, prévoit qu'un OGM ne peut être mis sur le marché ou disséminé dans l'environnement sans autorisation préalable. Cette autorisation ne peut être délivrée qu'après une évaluation au cas par cas des risques pour la santé et l'environnement <sup>(107)</sup> ; en l'absence d'une telle autorisation pour l'usage concerné, la mise sur le marché ou la dissémination de l'OGM est interdite. Le terme de dissémination volontaire désigne « toute introduction intentionnelle dans l'environnement d'un OGM ou d'une combinaison d'OGM pour laquelle aucune mesure de confinement spécifique n'est prise pour limiter leur contact avec l'ensemble de la population et l'environnement et pour assurer à ces derniers un niveau élevé de sécurité » <sup>(107)</sup>.

Conformément à l'arrêté du 28 mars 2012 relatif au dossier technique demandé pour les utilisations confinées d'OGM prévu aux articles R.532-6, R.532-14 et R.6532-26 du code de l'environnement <sup>(109)</sup>, un dossier de demande d'agrément doit être déposé auprès de la préfecture pour obtenir l'autorisation d'utilisation d'OGM à des fins de production industrielle. Cette demande est constituée d'un dossier technique contenant notamment les informations suivantes : personnes responsables du contrôle, de la surveillance et de la sécurité d'utilisation des OGM, description des organismes génétiquement modifiés, du produit et du procédé de



fabrication (type de vecteur, mise en jeu d'une étape de transfection par exemple...), objectifs de l'utilisation d'OGM et résultats escomptés (utilisation pour essais cliniques, quelle pathologie, dans quels pays...), volumes de culture, description des mesures de confinement et autres mesures de protection à appliquer (notamment sur la gestion des déchets), description des locaux dans lesquels seront manipulés les OGM. Ces informations doivent être complétées par une évaluation des risques potentiels sur la santé humaine, animale et/ou l'environnement, selon la directive 2009/41/CE <sup>(108)</sup>. Cette évaluation doit être fondée sur les éléments suivants :

- Identification de tout effet potentiellement nocif, pouvant être lié au micro-organisme receveur, au matériel génétique inséré, au vecteur, au micro-organisme génétiquement modifié qui en résulte ;
- Caractéristiques de l'opération ;
- Gravité des effets potentiellement nocifs ;
- Possibilité de réalisation de ces effets potentiellement nocifs.

Ce dossier de demande d'agrément OGM est constitué par le demandeur et transmis à la préfecture puis au Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) pour évaluation. Le HCB émet alors un avis sur la classe d'utilisation confinée de l'OGM concerné :

<b>C1</b>	Opérations mettant en œuvre des OGM du groupe I et dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est <b>nul ou négligeable</b>
<b>C2</b>	Opérations mettant en œuvre des OGM du groupe II et dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est <b>faible</b>
<b>C3</b>	Opérations mettant en œuvre des OGM du groupe III et dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est <b>modéré</b>
<b>C4</b>	Opérations mettant en œuvre des OGM du groupe IV et dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est <b>élevé</b>

*Tableau 6 : Description des 4 classes de confinement OGM*

Ces classes de confinement correspondent aux 4 niveaux de confinement définis à l'annexe IV de la directive 2009/41/CE (108) du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. Le HCB a ainsi établi un tableau de correspondance entre les groupes d'OGM et les classes de confinement <sup>(110)</sup> (Tableau Z) :

	Correspondance entre groupes de risque des OGM et des agents pathogènes			
	Non pathogènes	Pathogènes		
Selon l'ancienne nomenclature	GI	GII		
Selon le Code de l'environnement	GI	GII	GIII	GIV
Agents pathogènes pour l'Homme	G1	G2	G3	G4
Agents pathogènes pour les Animaux	G1	G2 (Ea1)	G3 (Ea2)	G4 (Ea3)
Agents pathogènes pour les Végétaux	G1	G2 (Ep1)	G3 (Ep2)	G4 (Ep3)
Classes de confinement des OGM	C1	C2	C3	C4

Tableau 7 : Correspondance entre les groupes d'OGM et les classes de confinement

Cette distinction en 4 groupes est prévue dans les articles L. 532-1 et D. 532-2 du Code de l'environnement. En plus du dossier de demande d'agrément, le laboratoire manipulant des OGM doit s'acquitter d'une taxe OGM, prévue dans l'article L.532-6 du code de l'environnement modifié par la loi n°2008-595 du 25 juin 2008 (article 13) : « Toute demande d'agrément pour une utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés est assortie du versement d'une taxe à la charge de l'exploitant de l'installation... dans la limite de 2 000 euros... selon les modalités fixées aux articles 81 à 95 du décret n° 62-1587 du 29 décembre 1962 portant règlement général sur la comptabilité publique. »

De cette classification en 4 groupes de niveau de confinement vont dépendre les mesures de protection à mettre en place (ou déjà mises en place) i) par le laboratoire fabricant et manipulant ces OGM, et ii) lors de l'administration à l'homme de ces OGM-médicaments, dans le cadre des essais cliniques.

### 2.1.2. Evaluation des risques et mesures de confinement

Les laboratoires et industries mettant en œuvre des OGM dans un processus de production industrielle sont soumis à la réglementation des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) <sup>(110)</sup>. Dans le cas du génie génétique, le danger peut être défini comme la propriété intrinsèque d'un OGM de pouvoir provoquer des dommages à la santé humaine, animale et/ou à l'environnement. L'évaluation d'un tel danger doit prendre en compte les dangers propres à l'organisme donneur (ou séquence génétique), au système vecteur, et à l'organisme receveur, dans lequel la séquence clonée sera transférée et exprimée <sup>(110)</sup>. La combinaison de ces trois éléments permettra d'évaluer le danger de l'OGM qui en résulte. Certains vecteurs peuvent présenter un danger lié à leur capacité d'intégration dans le génome de la cellule hôte. D'autres sont dangereux en raison de leur pathogénicité, de leur capacité à

se recombinaison avec (ou à être complétés par) des virus endogènes de l'homme. Ainsi, plus le risque est important, plus les mesures de confinement à mettre en œuvre lors de la production et de l'utilisation de l'OGM sont strictes. Concernant les vecteurs viraux, la classe de confinement dépend :

- Du **type de gène** (appelé « insert »), comme précisé dans l'annexe II.5 (« Mode de détermination de la classe des inserts de type B »). Les inserts sont classés en type A ou B en fonction de leur risque potentiel, la classe B regroupant les inserts les plus à risque pour la santé humaine et l'environnement. Ce groupe comprend par exemple les oncogènes, les gènes cellulaires présentant une mutation qui rend l'activité de la protéine codée constitutive et hautement transformante, les gènes codant pour des toxines susceptibles d'avoir un pouvoir pathogène...
- Et du **type de vecteur**, comme précisé dans l'annexe II.6 (« Vecteurs viraux ») du Manuel du HCB : défectif ou réplcatif, rétroviral, adénoviral, lentiviral, baculoviral...

Par exemple, la production de vecteurs baculoviraux défectifs avec un insert de classe A nécessite un confinement de classe C1, alors que la production de vecteurs adénoviraux réplcatifs avec un insert de classe B nécessite un confinement de classe C3 <sup>(110)</sup>. Pour la production industrielle de vecteurs thérapeutiques rLV ou rAAV, un confinement de classe C2 est requis.

Les conditions de confinement à respecter par les laboratoires de production industriels sont données dans l'annexe III.2 du Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés <sup>(110)</sup>. Ces mesures passent par des systèmes de barrières physiques, chimiques ou biologiques. Dans le cas des industries, elles consistent par exemple à limiter l'accès aux laboratoires concernés, à la formation du personnel manipulant les OGM, à l'inactivation des OGM dans le cadre de la gestion des déchets, au maintien du laboratoire à une pression d'air négative par rapport à l'environnement immédiat... Le détail des mesures de confinement pour les différentes classes est fourni en **annexe I** de cette thèse.

Des mesures de confinement doivent également être instaurées lors de l'administration d'OGM à l'homme à des fins thérapeutiques, comme c'est le cas dans les essais cliniques <sup>(110)</sup>. Les établissements de santé autorisés à réaliser ce type d'administration sont désignés par l'ANSM, qui évalue également les demandes d'autorisation d'essais cliniques des produits de thérapie génique. Dans le cas d'un traitement par thérapie génique *ex vivo*, l'OGM est introduit dans des cellules qui seront ensuite administrées au patient. Cette phase de manipulation se déroule en laboratoire confiné. Les cellules génétiquement modifiées ne produisent en général pas de vecteurs capables de se disséminer ; ainsi le risque de dissémination involontaire dans l'environnement associé à ces OGM est faible. Dans le cas d'un traitement de thérapie génique

*in vivo*, l'OGM est administré directement au patient ; cette voie expose à un risque plus élevé de dissémination involontaire via les fluides biologiques. Le personnel soignant qui réalise l'administration de l'OGM doit être spécifiquement formé. Dans les deux cas, si les vecteurs OGM mis en jeu sont des vecteurs réplicatifs (comme c'est le cas dans le traitement des cancers par exemple), des mesures particulières de confinement doivent être adoptées, en particulier concernant l'entourage du patient.

## 2.2. Bonnes pratiques de fabrication

Les médicaments de thérapie génique utilisés dans le cadre des essais cliniques doivent être fabriqués conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF, ou GMP « *Good Manufacturing Practices* ») : « L'application des BPF aux MTI expérimentaux vise d'une part à protéger les personnes se prêtant à la recherche clinique et d'autre part à assurer la fiabilité des résultats de l'essai clinique, notamment en garantissant l'uniformité des produits, et que les résultats de l'essai clinique ne soient pas affectés par des conditions de fabrication non satisfaisantes » <sup>(111)</sup>. L'OMS définit les BPF comme « un des éléments de l'assurance de la qualité, garantissant que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché ». Ainsi, à partir du stade de développement clinique des médicaments de thérapie génique, puis ensuite dans le cadre de leur commercialisation, la conformité aux BPF doit permettre d'assurer le niveau de qualité des médicaments produits, ainsi que leur sécurité d'utilisation et leur efficacité thérapeutique.

Les exigences BPF s'appliquent durant toute la vie du médicament, englobant tout le processus de fabrication du médicament de thérapie génique, depuis le prélèvement de la matière première biologique de départ jusqu'à la libération du produit fini, et garantissent selon des normes de qualité leur préparation, contrôle, conservation et transport. En plus des lignes directrices et Annexes des BPF générales, qui s'appliquent à tous les médicaments, des bonnes pratiques spécifiques aux médicaments de thérapie innovante ont été ajoutées au guide des BPF en 2019, suivant la décision du 6 mai 2019. Elles constituent le chapitre IV du Guide des BPF de l'ANSM. Ce guide ne déroge pas aux principes généraux valables pour l'ensemble des médicaments, mais précisent certaines particularités liées aux médicaments de thérapie innovante. Parmi ces particularités, celles en lien avec les aspects de production de médicaments de thérapie génique seront détaillées par la suite.

### 2.2.1. Production en conditions aseptiques <sup>(111)</sup>

Les médicaments de thérapie génique se présentent sous la forme de médicaments injectables et doivent donc répondre à l'Annexe I des BPF « *Manufacture of Sterile Medicinal Products* ».

Même s'ils subissent une étape de filtration stérilisante avant d'être répartis dans leur conditionnement primaire, ils doivent être fabriqués dans un environnement aseptique. La maîtrise d'un tel environnement passe par différents aspects, tels que la conception et la qualification des locaux de production, la formation et l'hygiène du personnel, la surveillance environnementale et la réalisation de simulation de procédé aseptique (media fill tests). Cette contrainte de fabrication en conditions aseptiques n'est pas spécifique aux médicaments de thérapie génique, mais occupe une part considérable des exigences réglementaires imposées. Une nouvelle version de l'Annexe I des BPF, actuellement en cours de révision, demande aux industriels de mettre en place une stratégie de contrôle de la contamination, qui doit prendre en compte toutes les mesures techniques et organisationnelles implémentées pour garantir que les produits stériles répondent à leurs attributs de qualité critique <sup>(112), (113)</sup>. On appelle cela la maîtrise de la CCS « Contamination Control Strategy ». Les différents points décrits par la suite font partie intégrante de la stratégie de contrôle de la contamination (toutefois la liste n'est pas exhaustive).

#### 2.2.1.1. Mesures techniques de la stratégie de contrôle de la contamination

##### *Conception des locaux de production*

Les locaux de production doivent être conçus de manière à concilier le respect des BPF et la réglementation OGM. Ils doivent donc permettre de réduire le risque de contamination microbiologique, particulaire et pyrogène, et doivent également pouvoir protéger l'environnement contre le risque de dispersion d'organismes génétiquement modifiés et ainsi respecter les niveaux de confinement OGM requis en fonction des vecteurs fabriqués. Selon les directives européennes <sup>(114)</sup>, « leur plan, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations, dont les contaminations croisées, le dépôt de poussières ou de saletés et, de façon générale, toute atteinte à la qualité des produits ».

Les médicaments de thérapie génique, comme tout médicament stérile, sont donc fabriqués dans des **zones à atmosphère contrôlée (ZAC)**, dont les matériaux doivent permettre de limiter la génération de particules internes. Dans le même objectif, l'absence de points d'accumulation et de recoins dans ces zones doit faciliter le nettoyage et la décontamination des locaux.

Les locaux de production doivent être en **pression différentielle** par rapport au reste des locaux. La pression différentielle peut être positive et empêcher la contamination particulaire de pénétrer dans la salle blanche, ou négative et empêcher la dissémination des OGM en dehors de la salle. La mise en place de cette cascade de pression implique la présence de sas entre la ZAC et l'environnement, qui sont notamment utilisés pour l'habillage et le déshabillage du

personnel lors de leurs entrées et sorties de ZAC, ainsi que pour l'entrée et la sortie des matières utilisées en production. Des systèmes d'interlockage entre les sas permettent de maintenir les cascades de pression. Afin de répondre aux BPF et à la réglementation OGM, une des solutions pour la production de vecteurs viraux est d'avoir un sas en surpression par rapport à la suite de production et par rapport au reste de la zone de production. Cela permet d'éviter l'entrée d'éventuels contaminants dans la suite de production, et également de confiner en évitant la sortie potentielle des vecteurs OGM fabriqués.

Les locaux doivent permettre l'évacuation des particules générées en interne par l'intermédiaire d'une **centrale de traitement d'air** (CTA). Celle-ci permet de maintenir la surpression (ou dépression) requise en fonction de la classe des zones, d'assurer le renouvellement de l'air (en volume d'air/heure) dans la pièce et de garantir un nombre de brassage d'air déplacé (en nombre de brassage/heure) requis par les normes pharmaceutiques BPF. L'air entrant dans la ZAC est contrôlé par des filtres HEPA (à haute efficacité sur les particules aériennes). Ces filtres sont capables de filtrer en un passage au moins 99,97 % des particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3 µm. Dans le cadre de la fabrication de médicament thérapie génique, il est notamment préconisé de ne pas renouveler l'air (100% air neuf) et de filtrer le soufflage et la reprise d'air des zones de production de vecteurs.

Les ZAC sont divisées en 4 classes de A à D conformément à la norme EN/ISO 14644-1 (la classe A étant réservée aux opérations de fabrication les plus critiques telles que le remplissage aseptique, et les classes C et D étant destinées aux étapes les moins critiques). Ainsi, pour toutes les étapes ouvertes ou critiques du procédé, la fabrication du médicament de thérapie génique sera réalisée sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire ou dans un isolateur hermétique de classe A, installés dans une ZAC de classement inférieur B, C ou D. En particulier, les étapes les plus critiques telles que la répartition aseptique du produit dans son contenant primaire peuvent être réalisées sous isolateur (classe A).

### ***Maîtrise des flux***

Afin de minimiser tout risque de contamination des produits liée à une intervention humaine, les flux de personnel, de matières et de déchets doivent être séparés. En particulier pour les sites multiproduits, une ségrégation spatiale et/ou temporelle doit être mise en place afin de limiter le risque de contamination croisée, définie comme la contamination d'un produit par un autre <sup>(114)</sup>. La ségrégation spatiale consiste par exemple à fabriquer 2 produits différents dans 2 suites de production différentes. Dans le cas de la ségrégation temporelle, la suite de production (ou le site entier) est dédié à la fabrication d'un unique produit en mode campagne. Cette campagne est alors suivie d'un procédé de nettoyage/désinfection dont l'efficacité a été validée. Le travail en mode campagne se définit par la conservation du matériel (autre que celui

en contact avec le produit) et de l'environnement pendant la durée de la campagne et pour un nombre de lots défini <sup>(115)</sup>.

Ainsi, l'entrée dans les zones de production doit se faire par des sas réservés au personnel et/ou au matériel et aux substances. Dans le cas où un seul sas permet le flux des matières et des déchets, les matières ne doivent en aucun cas se trouver dans ce sas en même temps que les déchets : il est nécessaire d'appliquer le principe de ségrégation temporelle. De plus, afin de répondre à la réglementation OGM, les déchets issus de la production de vecteurs viraux doivent faire l'objet de traitements spécifiques <sup>(110)</sup>. En général, la première étape de ce traitement consiste à inactiver les déchets sur le lieu de production. Une des solutions possibles pour l'inactivation des déchets solides, tels que les consommables à usage unique qui ont été en contact avec le produit OGM, est un autoclavage à 134°C avec un plateau de stérilisation de 20-30 minutes. Les déchets liquides quant à eux, doivent être inactivés par un traitement physique ou chimique. Dans tous les cas, le protocole de traitement des déchets doit être validé au cas par cas par le site industriel <sup>(110)</sup>.

### *Nettoyage et désinfection des locaux*

Le nettoyage et la désinfection des locaux de production constituent un élément majeur de la stratégie de contrôle de la contamination. Le nettoyage consiste à éliminer les contaminants présents afin de réduire les risques de contamination du produit, alors que la désinfection consiste à les détruire <sup>(116)</sup>. Différents types de produits peuvent être utilisés, en fonction de l'action requise : virucide, bactéricide, fongicide, sporicide... Il est recommandé d'utiliser plusieurs types de produits de nettoyage en alternance, afin d'éviter l'émergence de souches résistantes. En parallèle du nettoyage et de la désinfection des locaux par essuyage (réalisé en routine), la méthode de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) des locaux permet d'atteindre les zones inaccessibles (surfaces trop hautes, recoins, etc). Elle consiste à diffuser un brouillard du produit désinfectant (souvent du peroxyde d'hydrogène) dans l'ensemble du volume d'un local, qui sera réparti de façon homogène sur les surfaces. Les surfaces seront en contact avec le produit pendant une durée validée au préalable à l'aide d'indicateurs chimiques et/ou biologiques ; la durée validée doit permettre une réduction de la concentration de ces indicateurs de 4 log. Ce temps de contact est suivi d'un temps d'attente avant de pouvoir réutiliser les locaux décontaminés. Cette méthode de désinfection est employée pour différentes classes d'environnement ZAC : elle peut être aussi bien réalisée dans une suite de production de classe C que sous un isolateur de classe A, avant de pouvoir fabriquer ou répartir un autre produit et ainsi maîtriser la contamination interlots.

#### 2.2.1.2. Mesures organisationnelles de la stratégie de contrôle de la contamination

##### *Formation et hygiène du personnel<sup>(111)</sup>*

La qualité de l'environnement en ZAC dépend dans une grande mesure du savoir-faire, de la formation et du comportement du personnel impliqué. Le personnel doit comprendre les risques associés au procédé de fabrication mis en œuvre dans la zone de production. Dans une logique de limitation du risque d'apport de contamination microbiologique et particulaire dans la ZAC, le nombre de personnes présentes dans la ZAC doit être réduit au minimum.

Toutes les personnes travaillant en ZAC doivent recevoir une formation sur les bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles, incluant des notions relatives à l'hygiène et aux éléments de base en microbiologie. Cette formation concerne également les personnels de nettoyage des locaux. De plus, le personnel doit être formé à l'habillage lors de l'entrée en ZAC (et au déshabillage lors de la sortie de ZAC). En effet, des tenues particulières et de qualité adaptée (spécifiées dans la LD1 des BPF) doivent être revêtues en fonction de la classe de la ZAC. De plus, le personnel manipulant des OGM doit bénéficier d'une formation complémentaire afin de prévenir les risques de contamination croisée et les conséquences potentielles sur l'environnement.

##### *Surveillance environnementale<sup>(111)</sup>*

La surveillance de l'environnement de la zone de production permet d'évaluer l'efficacité des mesures de contrôle de la contamination et de garantir que les produits sont fabriqués dans un environnement aseptique. Les programmes de contrôles environnementaux comprennent notamment la surveillance des contaminations par des particules viables (microbiologique) et non viables (particulaire). Le niveau de contrôle de la ZAC (incluant la fréquence, le volume et la durée d'échantillonnage, la définition des limites d'alerte et d'action) est à définir au cas par cas, en fonction de l'étape de production et des risques pour le produit. Par exemple pour les étapes critiques en zone de classe A sous PSM ou en isolateur, des contrôles environnementaux doivent être réalisés dans ces équipements. Des contrôles permettant de mettre en évidence la présence éventuelle de micro-organismes (tels que des bactéries, levures, moisissures) doivent être réalisés. Ils passent notamment par l'utilisation de boîtes de sédimentation, d'échantillons volumétriques d'air et de prélèvements de surfaces. A la suite des opérations critiques au cours desquelles le produit est exposé à l'environnement, le personnel et les surfaces doivent faire l'objet d'une surveillance microbiologique.



### ***Validation du procédé aseptique (media fill tests)***

La validation du procédé de fabrication aseptique est un pré-requis à la production des médicaments stériles injectables, dont font partie les médicaments de thérapie génique. Cette validation consiste à simuler le procédé aseptique en remplaçant le produit par un milieu de culture, permettant de vérifier que le procédé de fabrication empêche la contamination du produit. Les contenants remplis de milieu de culture sont incubés pendant une durée et à une température définies, l'objectif étant d'obtenir une absence de croissance au terme de l'incubation. Le procédé aseptique est validé quand trois *media fill tests* consécutifs sont conformes en stérilité et en fertilité. Le test de stérilité du milieu permet de vérifier en cas de pousse si la contamination provient ou non du milieu utilisé, et le test de fertilité permet par le prélèvement du milieu de culture en fin de lot de prouver que l'absence de contamination n'est pas due à un milieu infertile. Ces tests de simulation du procédé aseptique permettent également d'habiliter les opérateurs. Parallèlement aux paramètres permettant de garantir la qualité des médicaments fabriqués en conditions d'asepsie, la qualité des matières entrant en jeu dans leur production est également un paramètre essentiel à prendre en compte.

#### **2.2.2. Matières premières et matières de départ <sup>(111)</sup>**

Les procédés de fabrication des médicaments de thérapie génique mettent en jeu des matières premières et des matières de départ d'origine biologique (telles que des cellules, de l'ADN, certains milieux de culture...), présentant de par leur nature une variabilité intrinsèque. Or la qualité des matières de départ et des matières premières constitue un élément essentiel qui impacte la qualité finale du médicament. En plus de la problématique de variabilité associée aux matières d'origine biologique, la problématique de sécurité microbiologique et virale occupe une place prépondérante dans la fabrication de ces médicaments. Ainsi, le fabricant de MTI doit définir des spécifications pour ces matières premières et de départ, qui doivent couvrir les aspects relatifs à la production, aux tests, au contrôle et à la conservation de ces matières. Afin de garantir la conformité des matières aux spécifications établies, le fabricant doit réaliser des contrôles sur ces matières ; le niveau de contrôle est alors proportionnel au risque associé à chaque matière.

Par rapport aux parties I et II des BPF qui s'appliquent à tous les médicaments, des exigences plus poussées en termes de documentation et de traçabilité s'appliquent aux matières d'origine biologiques. En particulier, les matières premières d'origine animale telles que le sérum de veau fœtal ou l'albumine de sérum bovin (parfois utilisées pour compléter le milieu de culture), peuvent présenter un risque de contamination « TSE/BSE » (Transmissible Spongiform Encephalopathy / Bovine Spongiform Encephalopathy). Les encéphalopathies spongiformes sont causées par des prions (isoformes anormales de glycoprotéines cellulaires)

pathogènes touchant le système nerveux central et pouvant causer des pathologies telles que la maladie de la vache folle ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob (qui correspond à la forme humaine) <sup>(117)</sup>. A la fin des années 1990, il a été mis en évidence que la transmission de TSE des animaux vers les humains était possible via l'ingestion de viande contaminée. L'utilisation de telles matières premières présente donc un risque pour le produit et pour le patient, il est donc nécessaire de mettre en place les précautions adéquates pour éviter toute contamination, dans le cas où l'utilisation de ces matières ne peut être évitée. Ces matières sont donc fournies avec un certificat TSE/BSE attestant que la Direction européenne de la qualité du médicament a vérifié la conformité de ces matières à la Pharmacopée Européenne, notamment à la monographie 5.2.8 « *Minimising the risk of transmitting TSE via medicinal products* » <sup>(117), (118)</sup>. Ces certificats sont reconnus par les pays membres de la Pharmacopée Européenne ainsi que par d'autres institutions telles que la FDA.

A côté des matières d'origine animale précédemment citées, les matières de départ biologiques doivent également suivre ce principe de maîtrise de la contamination et de la variabilité, intrinsèque à leur nature <sup>(114)</sup>. Par exemple, l'origine des cellules utilisées doit être documentée de façon détaillée, de même que les manipulations réalisées sur ces cellules, les conditions de culture, le nombre de passages cellulaires subis ; leur caractérisation doit être complète afin d'assurer au maximum la reproductibilité des lots de médicaments qui seront produits à partir de ces cellules. De plus, la notion de lots de semences et de banques de cellules a été introduite avec la création de la Partie IV des BPF (spécifique aux MTI). Ces systèmes de banques seront décrits dans la partie III.A de cette thèse.

### 2.3. Pharmacopée Européenne

Concernant la qualité des matières premières, des matières de départ, des intermédiaires de fabrication ou des produits finis, les Bonnes Pratiques de Fabrication font mention de la Pharmacopée Européenne. Cette dernière est un texte réglementairement opposable regroupant les standards officiels de contrôle qualité à appliquer pendant toute la durée de vie du médicament <sup>(119)</sup>. La Pharmacopée Européenne concerne également les substances entrant dans la composition des médicaments. Elle décrit les méthodes analytiques de références ainsi que les résultats attendus (si applicable). Les médicaments de thérapie génique étant des médicaments biologiques, une attention particulière doit être portée sur les aspects de sécurité microbiologique et virale liée à l'utilisation de matières premières d'origine biologique, en lien avec la Monographie 5.2.12 « *Raw materials of biological origin for the production of cell based and gene therapy medicinal products* ». Les principaux chapitres de la Pharmacopée Européenne concernant les médicaments de thérapie génique sont résumés dans le [Tableau 8](#) (liste non exhaustive).

N° chapitre	Titre du chapitre
Textes généraux	
5.2.12	Raw materials of biological origin for the production of cell based and gene therapy medicinal products
5.14	Gene transfer medicinal products for human use
Monographies	
2262	Bovine serum
2323	Human haematopoietic stem cells
Sécurité microbiologique et virale	
2.6.1	Sterility
2.6.14	Bacterial endotoxins
2.6.27	Microbiological examination of cell-based preparations
2.6.30	Monocyte-activation test
2.6.7	Mycoplasmas
5.1.6	Alternative methods for control of microbiological quality
5.1.7	Viral safety
5.2.8	Minimising the risk of transmitting TSE via medicinal products
Méthodes analytiques (numération et viabilité cellulaires)	
2.6.21	Nucleic acid amplification techniques
2.6.35	Quantification and characterization of residual host-cell DNA
2.7.23	Numeration of CD34/CD45+ cells in haematopoietic products
2.7.24	Flow cytometry
2.7.28	Colony-forming cell assay for human haematopoietic progenitor cells
2.7.29	Nucleated cell count and viability

Tableau 8 : Principaux chapitres de la Pharmacopée Européenne concernant les médicaments de thérapie génique

En parallèle des textes réglementaires opposables auxquels doivent se soumettre les développeurs et producteurs de médicaments de thérapie génique, l'émergence de tels médicaments a entraîné la nécessité de mettre en place de nouvelles recommandations. Ces dernières ne sont pas opposables au niveau réglementaire, mais constituent des lignes directrices appliquées par un nombre croissant d'autorités réglementaires, dans une optique d'harmonisation de plus en plus globale.

### 3. Guidelines & aides au développement

#### 3.1. Guidelines ICH

Le Conseil International d'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain, créé en 1990, a pour but d'harmoniser les données à fournir et les règlements à respecter dans le cadre du développement d'un médicament, et ainsi de

s'assurer de la sûreté, de la qualité et de l'efficacité des médicaments développés et enregistrés par les différents pays participants. Les lignes directrices développées par l'ICH sont classées en 3 groupes selon les 3 grands principes requis pour les médicaments : qualité, efficacité et sécurité (sous le terme de « considerations »), cf [Tableau 9](#). Les principes généraux s'appliquant à tout type de médicament ont été établis dans les années 1990-2000, alors que les guidelines plus spécifiques des médicaments de thérapie génique datent de la fin des années 2000 <sup>(120)</sup>.

N° guideline	Référence	Titre
<b>Qualité</b>		
<b>ICH Q5A</b>	CPMP/ICH/295/95	Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin
<b>ICH Q5B</b>	CPMP/ICH/139/95	Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products
<b>ICH Q5C</b>	CPMP/ICH/138/95	Stability testing of biotechnological/biological products
<b>ICH Q5D</b>	CPMP/ICH/294/95	Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products
<b>ICH Q5E</b>	CPMP/ICH/5721/03	Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process
<b>ICH Q6B</b>	CPMP/ICH/365/96	Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products
<b>ICH Q7</b>	CPMP/ICH/4106/00	Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients
<b>ICH Q8</b>	CHMP/ICH/167068/2004	Pharmaceutical development
<b>ICH Q9</b>	CHMP/ICH/24235/2006	Quality risk management
<b>ICH Q10</b>	CHMP/ICH/214732/2007	Pharmaceutical quality system
<b>ICH Q11</b>	CHMP/ICH/425213/2011	Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities)
<b>ICH Q12</b>	EMA/CHMP/ICH/804273/2017 EMA/CHMP/ICH/831751/2017 EMA/CHMP/ICH/78332/2020	Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management
<b>Efficacité</b>		
<b>ICH E1</b>	CPMP/ICH/375/95	The extent of population exposure to assess clinical safety
<b>ICH E3</b>	CPMP/ICH/137/95	Structure and content of clinical study reports
<b>ICH E4</b>	CPMP/ICH/378/95	Dose response information to support drug registration
<b>ICH E6</b>	CPMP/ICH/135/95	Good clinical practice
<b>ICH E7</b>	CPMP/ICH/379/95	Geriatrics

N° guideline	Référence	Titre
ICH E8	CPMP/ICH/291/95	General considerations for clinical trials
ICH E11	CPMP/ICH/2711/99	Clinical investigation of medicinal products in the paediatric population
<b>Sécurité (“considerations”)</b>		
/	CHMP/ICH/469991/2006	General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors
/	EMA/CHMP/ICH/449035/2009	General principles to address virus and vector shedding
/	EMA/CHMP/ICH/607698/2008	Oncolytic Viruses

Tableau 9 : Principales guidelines ICH applicables aux médicaments de thérapie génique <sup>(121)</sup>

### 3.2. Guidelines CAT

Le CAT (*Committee for Advanced Therapies* ou Comité des Thérapies Innovantes) est un comité intégré à l'Agence Européenne du Médicament et des produits de santé. Il a pour rôles l'évaluation des dossiers d'AMM des MTI, la classification des MTI, l'émission d'avis scientifiques auprès des développeurs concernant l'évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité du MTI en développement, ainsi que l'élaboration de recommandations pour le développement des MTI <sup>(122)</sup>. En effet, ces nouvelles recommandations basées sur une approche multidisciplinaire semblaient indispensables car :

- Les MTI reposent sur des concepts et des mécanismes d'action nouveaux ;
- Les approches liées à la qualité, à la sécurité et à l'efficacité devaient être adaptées à cette nouvelle classe de médicaments, en conservant le principe d'évaluation de la balance bénéfice/risque ;
- En fonction de la nature des produits, d'autres questions spécifiques peuvent être soulevées (éthique, méthodologie, suivi à long terme...).

Ainsi, certaines recommandations non spécifiques aux médicaments de thérapie génique, précisent les points à considérer lors du développement et de la fabrication de médicaments biologiques (Tableau 10).

Référence	Titre
EMA/CHMP/BWP/473191/2006	Guideline on environmental risk assessments for medicinal products consisting of, or containing, genetically modified organisms (GMOs)
CPMP/BWP/1793/02	Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products
CPMP/BWP/328/99	Development pharmaceuticals for biotechnological and biological products
CPMP/BWP/268/95 or 3AB8A	The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses
EMA/410/01	Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products
CHMP/CAT/BWP/353632/2010	CHMP/CAT position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and advanced therapy medicinal products
CPMP/BWP/1143/00	Position statement on the use of tumorigenic cells of human origin for the production of biological and biotechnological medicinal products
3AB7A	Use of transgenic animals in the manufacture of biological medicinal products for human use
3AB11A	Tests on samples of biological origin

Tableau 10 : Recommandations liées au développement de médicaments biologiques (liste non exhaustive)

D'autres recommandations traitent de sujets très spécifiques liés à la manipulation et à l'introduction d'ADN dans le corps humain, telles que le « *Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis* » (discuté dans la partie I de cette thèse) ou la recommandation sur le suivi à long terme des patients ayant reçu l'administration d'un génomédicament (Tableau 11). Ces recommandations, souvent liées aux problématiques de sécurité microbiologique et virale précédemment citées, doivent également être intégrées par les développeurs de MTI.

Référence	Titre
EMA/CAT/499821/2019	Questions and answers on comparability considerations for advanced therapy medicinal products (ATMP)
EMA/CAT/80183/2014	The overarching guideline for human gene therapy medicinal products is the Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products
EMA/CAT/80183/2014	Questions and answers on gene therapy
CHMP/GTWP/125491/06	Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products
EMA/CAT/GTWP/44236/2009	Reflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during development
CHMP/GTWP/587488/07	Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues relating specifically to recombinant adeno-associated viral vectors

Référence	Titre
CAT/CHMP/GTWP/671639/2008	Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells
EMA/CHMP/GTWP/125459/2006	Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products
EMA/273974/2005	Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of the gene transfer vectors
CAT/190186/2012	Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis
EMA/CHMP/GTWP/60436/2007	Guideline on follow-up of patients administered with gene therapy medicinal products
EMA/149995/2008	Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of advanced therapy medicinal products
CHMP/BWP/2458/03	Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors

Tableau 11 : Recommandations européennes spécifiques au développement de médicaments de thérapie génique

Ainsi, parallèlement aux recommandations préexistantes concernant la qualité des médicaments, telles que les recommandations scientifiques de l'EMA au niveau européen, ou les guidelines ICH (*International Council for Harmonization*) au niveau international, de nouvelles recommandations européennes spécifiques au développement des médicaments de thérapie génique ont vu le jour.

Toutes les recommandations citées, émises par des équipes d'experts multidisciplinaires, présentent les méthodes d'approches à adopter lors du développement des médicaments de thérapie génique. Elles constituent des aides pour les développeurs et listent les points de considération à évaluer, depuis les étapes précoces de développement jusqu'à la soumission du dossier de demande d'AMM.

Après l'étude globale du contexte réglementaire encadrant les médicaments de thérapie génique, nous nous intéresserons dans la prochaine partie à leur procédé de fabrication, et plus particulièrement à la production de vecteurs recombinants rAAV.

### III. Les enjeux de la production industrielle des vecteurs viraux

#### **Partie A : le procédé de production de vecteurs viraux recombinants rAAV**

##### 1. Introduction

Le potentiel des vecteurs AAV recombinants (rAAV) en tant que vecteurs de thérapie génique n'est plus à démontrer. De nombreux essais employant des rAAV ont montré des résultats très prometteurs, et un nombre croissant de MTG en développement atteint le stade clinique. De par leurs caractéristiques d'expression à long terme du transgène, d'absence de pathogénicité et de tropismes cellulaires variés, les rAAV constituent des vecteurs de choix pour le développement de médicaments de thérapie génique et sont largement utilisés dans les essais cliniques actuels. Toutefois, le développement de systèmes de production et de purification capables de générer des quantités suffisantes de vecteurs pour faire face à la demande constitue un réel défi. En effet, le passage au stade clinique requiert la production d'une quantité de vecteurs bien supérieure à celle nécessaire aux phases de recherche et préclinique. Pour supporter les essais cliniques, les méthodes de production doivent permettre de produire des vecteurs de haute pureté, activité et sécurité, et ceci à des coûts acceptables en vue d'une éventuelle commercialisation <sup>(123)</sup>. Ainsi, la mise au point de procédés de fabrication robustes, reproductibles et industrialisables permettant de fournir la quantité requise de vecteurs du niveau de qualité souhaité, est un réel enjeu pour le développement des médicaments de thérapie génique.

Comme tout médicament issu de la biotechnologie, les vecteurs viraux de thérapie génique ont une structure biologique complexe. Ainsi, de la même façon que l'on produit des protéines ou des anticorps recombinants, les vecteurs viraux vont être produits par des cellules qui servent alors de système d'expression. La machinerie cellulaire avec son système de transcription et de traduction, va être « détournée » pour produire les particules virales modifiées portant le gène thérapeutique. Le procédé de fabrication des vecteurs viraux est divisé en deux parties principales. Les étapes « *upstream* » comprennent les phases d'amplification cellulaire, de transfection et de production des particules virales. Les étapes « *downstream* » consistent à purifier les vecteurs viraux récoltés. Les vecteurs viraux purifiés sont ensuite répartis dans leur contenant final lors de l'étape de répartition aseptique.



## 2. Stratégies de production des vecteurs viraux recombinants

Différentes stratégies peuvent être employées pour la production de vecteurs viraux. Les méthodes les plus décrites comprennent la transfection transitoire de cellules, qui consiste à donner aux cellules les informations génétiques nécessaires à la production des vecteurs viraux sous forme de plasmides, ou le développement de lignées cellulaires stables comprenant déjà ce matériel génétique <sup>(124)</sup>. Si ces méthodes sont comparables en termes de rendements (elles permettent de produire  $10^4$  à  $10^5$  *vector genome* (VG) par cellule), la transfection transitoire de cellules HEK293 reste la plus utilisée <sup>(124)</sup>.

### 2.1. Transfection transitoire d'ADN plasmidique

#### 2.1.1. Systèmes de production utilisant des virus (transfection et infection)

Trois éléments doivent être apportés aux cellules pour leur permettre de produire des vecteurs viraux <sup>(125)</sup> :

- La construction génétique contenant le transgène thérapeutique flanqué des séquences ITR du génome de l'AAV sauvage (plasmide pAAV)
- Les séquences Rep et Cap (plasmide pHelper) apportant les fonctions de l'AAV (gènes de régulation et des protéines de capsid)
- Les fonctions du virus auxiliaire (généralement un adénovirus), permettant la réplication active de l'AAV (plasmide pAd)

Les deux premiers éléments sont apportés aux cellules sous forme de plasmides (molécules d'ADN circulaires) par transfection. Les fonctions auxiliaires peuvent être apportées par une étape d'infection des cellules par le virus helper, ou sous forme de plasmide également.

Le premier système de production des rAAV était basé sur une double transfection des cellules productrices par les plasmides pAAV et pHelper, suivie d'une infection des cellules par le virus auxiliaire. En effet, les gènes responsables des fonctions auxiliaires n'étaient pas clairement identifiés et ne pouvaient donc pas être apportés sous forme de plasmide <sup>(126)</sup>. Quelques heures après la double transfection des cellules, ces dernières étaient infectées par le virus helper sauvage, le plus souvent un adénovirus. Après 2 ou 3 jours, l'accumulation de rAAV dans les cellules atteint son maximum. Les cellules sont alors récoltées pour subir ensuite les étapes de purification.

Un des inconvénients majeurs de cette méthode est la nécessité d'éliminer le virus helper sauvage, qui constitue un contaminant indésirable pouvant impacter la sécurité virale du médicament. Une solution partielle à cette problématique a été de remplacer les adénovirus sauvages par des adénovirus dont les gènes E1 ont été délétés, afin de les rendre non réproductifs

<sup>(126)</sup>. Cependant, le gène E1 est indispensable pour la réplication des AAV ; les cellules transfectées devaient donc exprimer ce gène. C'est le cas des cellules HEK293, qui seront décrites par la suite. Cette méthode permettait d'obtenir des titres de  $10^2$  à  $10^3$  VG par cellule, mais la contamination par l'adénovirus helper restait problématique, pouvant déclencher des réactions immunitaires chez le patient lors de l'administration si l'adénovirus n'est pas complètement éliminé. Or l'élimination de ce virus par la chaleur n'était pas entièrement efficace et pouvait en plus entraîner une diminution du titre en rAAV. Des virus chimériques peuvent être utilisés pour infecter les cellules à la place des virus sauvages. Ces virus recombinants portent les éléments nécessaires à la production des rAAV mais ont été modifiés génétiquement afin de diminuer leur pathogénicité <sup>(125)</sup>.

### 2.1.2. Systèmes de production sans virus (transfection)

A la fin des années 1990, l'adénovirus sauvage ou délété du gène E1 a été remplacé par un plasmide portant les fonctions helper nécessaires à la réplication du rAAV <sup>(126)</sup>. Les cellules étaient alors transfectées par 3 plasmides différents : pAAV, pHelper et pAd (Figure 32). Cette méthode de tri-transfection a permis d'éliminer les adénovirus ou tout autre virus helper du procédé de fabrication des rAAV, et donc de supprimer une source de contaminant problématique pouvant impacter la sécurité du produit. Une seule étape de transfection permettait de fournir aux cellules tous les éléments nécessaires pour la production des rAAV. Cependant, chaque cellule devait être transfectée efficacement par les 3 plasmides pour pouvoir produire des vecteurs rAAV. Ainsi un système de transfection par 2 plasmides au lieu de 3 a été mis au point. Les cellules étaient alors transfectées par un premier plasmide portant le gène thérapeutique, et un second plasmide portant les gènes Rep et Cap ainsi que les fonctions auxiliaires <sup>(127)</sup>. Avec ce système, les titres en vecteurs obtenus étaient compris entre  $10^2$  et  $10^4$  VG par cellule.

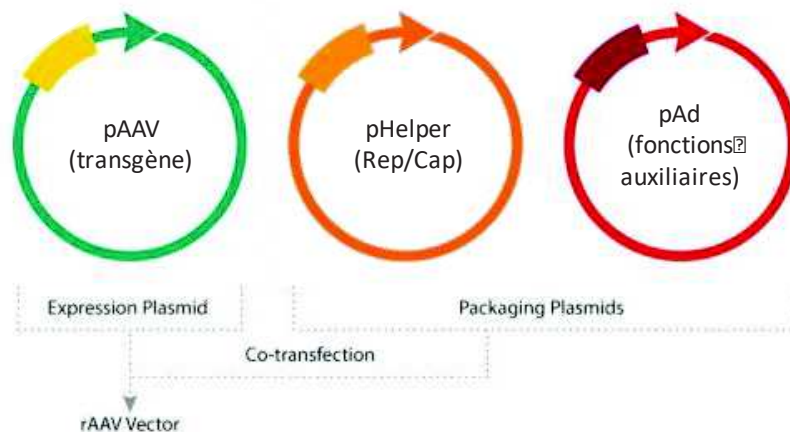


Figure 32 : Principe de la tri-transfection <sup>(128)</sup>

Les limites des méthodes reposant uniquement sur la transfection des cellules sont inhérentes à la variabilité de l'efficacité de l'étape de transfection. De plus, bien que ce système évite l'utilisation de virus sauvages, la génération de virus AAV répliatifs reste théoriquement possible, par phénomène de recombinaison entre le vecteur et le plasmide helper <sup>(126)</sup>, <sup>(125)</sup>. Les plasmides doivent donc être construits de façon à minimiser la production de rcAAV (*replication competent AAV*). Cette méthode présente l'avantage d'une mise en place assez rapide et versatile, et permet de produire différents sérotypes de rAAV en changeant le gène Cap sur le plasmide helper <sup>(129)</sup>.

Pour une utilisation en clinique et dans des conditions BPF, le procédé de transfection transitoire requiert la caractérisation des plasmides, des agents de transfection et des lignées cellulaires utilisés. Afin d'éviter cette étape longue et fastidieuse, des méthodes ne nécessitant pas de transfection ont été développées. Elles reposent sur l'utilisation de lignées cellulaires d'emballage ou de lignées cellulaires productrices.

## 2.2. Utilisation de lignées cellulaires d'emballage ou lignées cellulaires productrices

### 2.2.1. Lignée cellulaire d'emballage

Le système de lignée cellulaire d'emballage consiste à développer une lignée cellulaire stable exprimant les gènes Rep et Cap, indispensables à la formation de la capsid des vecteurs viraux <sup>(126)</sup>. Dans ce système, les vecteurs viraux sont produits suite à l'infection des cellules par un virus hybride portant le gène thérapeutique, et par un virus helper ([Figure 33](#)). Cette méthode permet d'obtenir des quantités de vecteurs comparables à la méthode de tri-transfection et présente l'avantage d'être assez versatile : une unique lignée cellulaire d'emballage peut être utilisée pour produire différents vecteurs AAV du même sérotype <sup>(126)</sup>. Un des inconvénients majeurs des lignées d'emballage reste l'étape d'infection des cellules par un virus helper (le plus souvent un adénovirus). En effet, suite à l'infection des cellules par cet adénovirus helper, les cellules se mettent à produire des vecteurs rAAV, mais également des adénovirus, contaminants indésirables qui devront être éliminés <sup>(130)</sup> (cette problématique est commune avec la méthode de transfection puis infection).

### 2.2.2. Lignée cellulaire productrice

Le système de lignée cellulaire productrice consiste à mettre au point une lignée cellulaire comportant les gènes Rep et Cap ainsi que le gène thérapeutique. Ainsi, seules les fonctions helper doivent être apportées pour induire la production des vecteurs viraux <sup>(131)</sup>. Cette étape se fait généralement par l'infection des cellules par un virus helper ([Figure 33](#)). On retrouve donc avec cette méthode la même problématique de production concomitante de rAAV et de

virus helper <sup>(126)</sup>. Le développement de lignées cellulaires productrices peut se faire par transfection d'une lignée d'emballage (décrite ci-dessus) avec le gène thérapeutique associé à un gène de résistance, permettant de sélectionner les cellules ayant intégré le gène thérapeutique <sup>(132)</sup>. En général, les titres en vecteurs AAV recombinants obtenus avec cette méthode sont compris entre  $10^3$  et  $10^5$  VG par cellule <sup>(132)</sup>. Cependant le développement de lignées cellulaires productrices reste complexe car certains gènes nécessaires à la synthèse des vecteurs sont cytotoxiques <sup>(133)</sup>.

Des rendements de  $10^5$  VG par cellule ont été obtenus avec cette méthode, avec un ratio VG/IU (*infectious unit*) comparable à ceux obtenus par un procédé de transfection d'ADN plasmidique <sup>(131)</sup>. L'utilisation de cette méthode de production en clinique est toutefois limitée. En effet, la génération de lignées cellulaires stables est une étape longue et fastidieuse, et doit être réalisée pour chaque combinaison de transgène et de sérotype <sup>(131)</sup>. De plus, les étapes de caractérisation de telles lignées ainsi que l'évaluation de leur stabilité et de leur productivité sont très coûteuses. Ces méthodes requièrent également la production de virus hybrides, elle-même longue et coûteuse. La mise au point d'étapes de purification permettant d'éliminer les virus helper reste également un obstacle <sup>(129)</sup>.

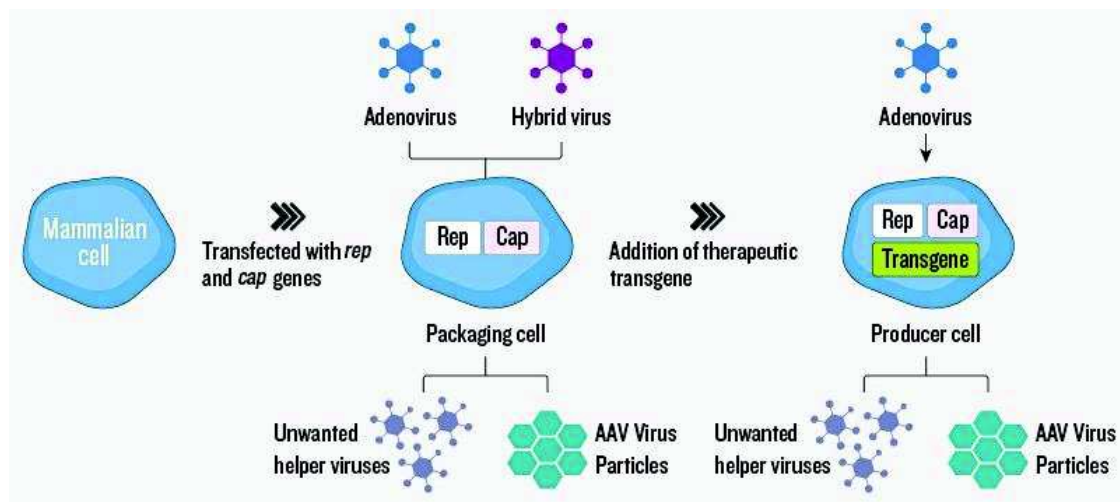


Figure 33 : Principe des lignées cellulaires d'emballage et des lignées cellulaires productrices <sup>(134)</sup>

### 2.3. Système d'expression baculoviral

Ce système d'expression est basé sur les mêmes principes que les deux méthodes précédemment décrites, mais utilise comme système d'expression des cellules d'insectes (généralement des cellules Sf9 – *Spodoptera frugiperda*) à la place des cellules humaines. Pour introduire dans ces cellules d'insectes les séquences génétiques nécessaires à la production de vecteurs viraux, on détourne les propriétés d'infectivité des baculovirus, virus qui ont pour cibles ces cellules d'insectes <sup>(135)</sup>. Ces cellules sont infectées au moyen de baculovirus

recombinants, dérivés du virus de la polyhédrose de l'*Autographa californica*, un papillon communément appelé autographe de la luzerne.

Dans un premier temps, le gène d'intérêt (Rep, Cap ou transgène) est introduit dans un baculovirus, créant ainsi un baculovirus recombinant appelé « bacmid »<sup>(136)</sup> (Figure 34). Ces bacmids sont utilisés pour transformer des cellules d'insectes, qui vont en produire de grandes quantités. Les bacmids ainsi produits, portant l'information pour le gène thérapeutique et les protéines de structure des AAV (Rep et Cap), vont infecter des cellules d'insectes productrices, qui vont produire les vecteurs viraux recombinants<sup>(137)</sup>.

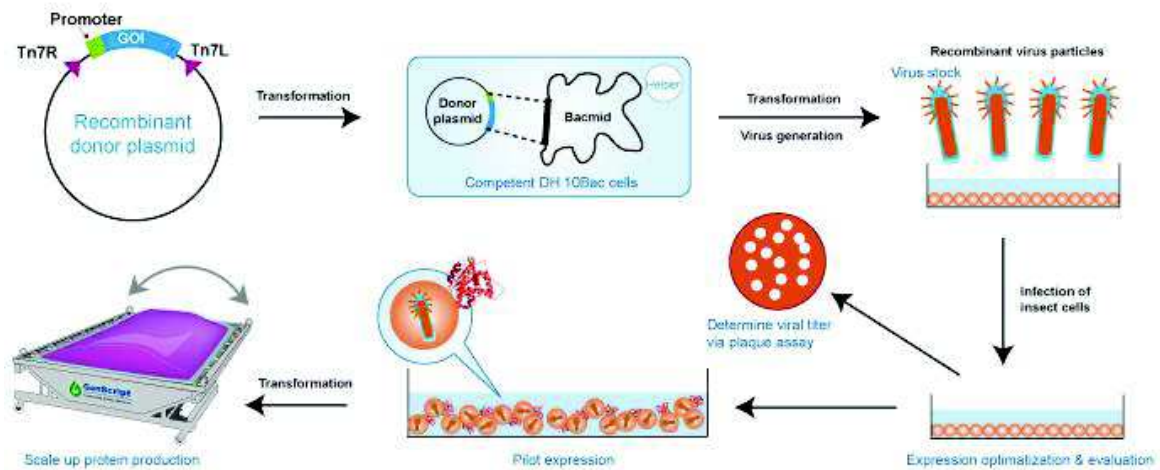


Figure 34 : Principe de production de protéines recombinantes par un système baculoviral<sup>(138)</sup>

Selon le même principe que les lignées cellulaires d'emballage, des lignées stables de cellules d'insectes portant les séquences Rep et Cap, peuvent être mises au point<sup>(139)</sup>. La production de rAAV est déclenchée par l'infection des cellules par les baculovirus recombinants contenant le gène thérapeutique. L'utilisation de ce système incluant un fort promoteur, permet d'obtenir des rendements élevés en vecteurs : des titres allant jusqu'à  $5.10^4$  VG par cellule ont été rapportés<sup>(130)</sup>. Les cellules d'insectes ont l'avantage de réaliser la plupart des modifications post-traductionnelles rencontrées chez les cellules de mammifères et de permettre un scale-up en bioréacteur<sup>(126)</sup>. Toutefois, ce système soulève le problème de production de baculovirus concomitante à la production de rAAV, précédemment cité dans le cas de l'utilisation de lignées cellulaires productrices ou d'emballage. Le risque de générer des vecteurs rAAV répliatifs reste également présent. Un phénomène d'instabilité du transgène dans le baculovirus a été rapporté<sup>(129)</sup>, soulignant le défi que représente la production de vecteurs viraux AAV mammifères dans des cellules d'insectes.

### 3. Des matériels de départ biologiques complexes

Comme expliqué au paragraphe précédent, la production de vecteurs viraux de thérapie génique requiert 4 éléments indispensables <sup>(125)</sup> :

- Le gène thérapeutique flanqué des régions ITR du génome AAV ;
- Les séquences Rep et Cap nécessaires à la réplication des AAV et à la production des protéines de capsid ;
- Les fonctions du virus helper, ou fonctions auxiliaires ;
- Une lignée cellulaire capable de produire les vecteurs AAV recombinants.

La qualité des vecteurs produits, et par extension des médicaments de thérapie génique fabriqués, dépend de la qualité de ces plasmides et cellules, qui sont considérés comme des matériels de départ mais présentent à eux seuls une grande complexité de par leur fabrication et leur origine biologique, impliquant une importante variabilité. D'après les Bonnes Pratiques de Fabrication spécifiques aux Médicaments de Thérapie Innovante <sup>(114)</sup>, une attention particulière doit être apportée afin d'éviter toute contamination de ces matériels de départ, et de limiter autant que possible leur variabilité. Des spécifications relatives à ces matériels de départ doivent être établies, et doivent permettre de couvrir leur production, leur contrôle et leur stockage. Le principe des banques de cellules et de plasmides seront décrits par la suite.

#### 3.1. Banques de cellules

##### 3.1.1. Définition

Les cellules constituent le système d'expression des vecteurs viraux recombinants. Une lignée cellulaire peut être définie comme un ensemble de cellules issues d'une population cellulaire primaire par mitoses successives, présentant les mêmes caractères structurels et fonctionnels <sup>(140)</sup>. Selon la stratégie de production adoptée, le développement d'une lignée cellulaire peut concerner la lignée cellulaire qui subira la tri-transfection (dans le cas d'une transfection transitoire), ou les lignées cellulaires productrices ou d'emballage. Dans le cadre de la production des rAAV, comme de tout autre produit recombinant, les cellules sont organisées selon un système de banques.

##### 3.1.2. Principe des banques cellulaires

Une banque de cellules est un ensemble de contenants, en général des flacons ou ampoules, qui contiennent chacun un aliquot provenant d'un seul pool de cellules, de composition uniforme et stockées dans des conditions définies <sup>(141)</sup>. Ce système de banques cellulaires est composé de 2 parties : les banques cellulaires primaires, appelées Master Cell Banks (MCB), et les banques cellulaires de travail, appelées Working Cell Banks (WCB). Il permet

l'approvisionnement continu en cellules tout au long du cycle de vie du médicament, et d'assurer que ces cellules seront équivalentes et convenablement caractérisées, réduisant ainsi la variabilité inhérente à ce matériel de départ biologique. Tous les lots de production seront donc issus d'une seule et même source de cellules caractérisée.

La caractérisation complète des banques cellulaires permet également de limiter le risque de contamination des cellules par des agents adventices. Généralement, la MCB est produite en premier, à partir d'un clone initial ou d'une banque cellulaire déjà dérivée d'un clone initial <sup>(141)</sup>. Une WCB est ensuite produite à partir d'un ou plusieurs flacons de la MCB. Ce sont des flacons de ces WCB qui seront utilisés lors de la production des vecteurs viraux recombinants. Au fur et à mesure de l'utilisation des WCB, de nouvelles WCB sont générées à partir de la MCB, afin de maintenir un stock suffisant de cellules pour assurer les productions (**Figure 35**). Ces nouvelles WCB doivent être caractérisées et contrôlées selon les spécifications définies.

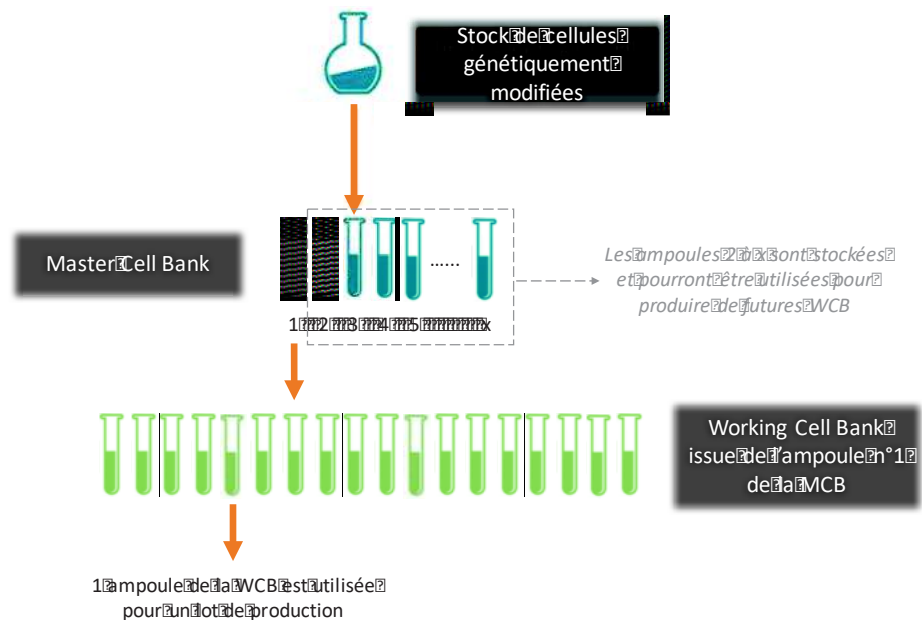


Figure 35 : Principe de fonctionnement d'un système de banque cellulaire

Dans le cas où un faible nombre de flacons sont nécessaires, seule une MCB peut être produite. Généralement, la préparation des banques cellulaires se fait par des étapes de culture cellulaire successives, en augmentant progressivement la taille ou le nombre de flacons de culture jusqu'à obtention d'une quantité de cellules suffisante pour les répartir dans la quantité de flacons souhaitée et à la concentration cellulaire désirée. Afin d'assurer une composition homogène dans chaque contenant de la banque cellulaire, il est conseillé de pooler le contenu des différents flacons de culture avant de les répartir dans les flacons ou ampoules constituant la banque <sup>(141)</sup>. Les propriétés des cellules utilisées pour la production des rAAV impactent la qualité et la sécurité de ces derniers ; il est donc nécessaire de réaliser une caractérisation complète des banques cellulaires avant leur utilisation en production.

### 3.1.3. Caractérisation et contrôle des banques cellulaires

#### 3.1.3.1. Origine, source et histoire des cellules

La source à partir de laquelle ont été dérivées les cellules doit être indiquée et peut être associée à toute documentation issue du laboratoire source et à des références bibliographiques pertinentes <sup>(141)</sup>. L'historique de culture des cellules, les procédures ou protocoles suivis lors des étapes de culture, ainsi que toute manipulation génétique des cellules doivent être documentés. Les mesures employées pour éviter la contamination des cellules par des agents infectieux doivent être décrites, de même que les différents constituants des milieux de culture utilisés, en particulier ceux comportant des matériels d'origine animale tels que du sérum ou des enzymes. Toutes ces informations sont regroupées dans la « cell line history ».

#### 3.1.3.2. Principes généraux de caractérisation et de contrôle des banques cellulaires

La caractérisation et le contrôle des banques cellulaires constituent un élément essentiel du contrôle des produits de biotechnologie tels que les vecteurs viraux recombinants. La caractérisation consiste à établir principalement l'identité, la pureté et la stabilité ; elle est réalisée en général sur la MCB <sup>(141)</sup>. Le contrôle a pour but de confirmer l'identité, la pureté et la pertinence des cellules pour une utilisation en production. Les contrôles réalisés dépendent du type de cellules, de leurs propriétés biologiques, de leur historique de culture et de la faisabilité des tests <sup>(141)</sup>. Les tests d'identité peuvent être basés sur des caractéristiques phénotypiques (telles que l'analyse de la morphologie des cellules) ou génotypiques (par exemple la mise en évidence de marqueurs ou d'isoenzymes spécifiques). Les tests de pureté consistent à montrer l'absence de contaminants microbiens et cellulaires. Enfin, les tests de stabilité comportent deux versants : la démonstration d'une capacité de production constante du produit désiré par les cellules, et le maintien de cette capacité de production dans les conditions de stockage définies <sup>(141)</sup>. Dans le cas des lignées cellulaires productrices, l'expression du transgène doit également être évaluée.

Toutes les lignées cellulaires utilisées pour la production de rAAV devraient être testées selon les principes décrits dans la monographie 5.2.3 de la pharmacopée européenne « *Cell substrates for the production of vaccines for human use* » <sup>(125)</sup>. Les tests à réaliser sont séparés en 3 groupes distincts qui reprennent ceux de la caractérisation : identité et pureté, agents étrangers (tests liés à la sécurité) et enfin tumorigénicité pour certains types cellulaires (Tableau 12).



Table 5.2.3-1 – Testing of cell lines

Test	Cell seed	Master cell bank (MCB)	Working cell bank (WCB)	Cells at or beyond the maximum population doubling level used for production
<b>1. IDENTITY AND PURITY</b>				
Morphology	+	+	+	+
Relevant selection of the following tests: biochemical (e.g. isoenzymes), immunological (e.g. histocompatibility), cytogenetic markers, nucleic acid fingerprinting	+	+	+	+
Karyotype (diploid cell lines)	+	+	+(1)	+(1)
Life span (diploid cell lines)	-	+	+	-
<b>2. EXTRANEIOUS AGENTS</b>				
Bacterial and fungal contamination	-	+	+	-
Mycoplasmas	-	+	+	-
Tests in cell cultures	-	-	+	-
Co-cultivation	-	-	+(2)	+(2)
Tests in animals and eggs	-	-	+(2)	+(2)
Specific tests for possible contaminants depending on the origin of the cells (see above under Infectious extraneous agents)	-	-	+(2)	+(2)
Retroviruses	-	+(3)	-	+(3)
<b>3. TUMORIGENICITY</b>				
Tumorigenicity	-	-	-	+(4)

(1) The diploid character is established for each working cell bank but using cells at or beyond the maximum population doubling level used for production.

(2) Testing is carried out for each working cell bank, but using cells at or beyond the maximum population doubling level used for production.

(3) Testing is carried out for the master cell bank, but using cells at or beyond the maximum population doubling level used for production.

(4) The MRC-5 cell line, the WI-38 cell line and the FRhL-2 cell line are recognised as being non-tumorigenic and they need not be tested. Tests are not carried out on cell lines that are known or assumed to be tumorigenic.

Tableau 12 : Extrait de la monographie 5.2.3 de la pharmacopée européenne (142)

Les contrôles relatifs à la sécurité des cellules sont essentiels : toute contamination des cellules doit être évitée. Aucune série de tests ne permet de détecter tous les contaminants potentiels (141), il est donc important de limiter les risques de contamination lors de la génération des banques cellulaires. Les méthodes utilisées pour éviter toute contamination doivent être décrites, et un système d'identification des contenants de la banque (flacons, ampoules...) doit être mis en place afin de pouvoir tracer les unités lors de leur stockage et de leur utilisation.

Selon la guideline ICH Q5A « *Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin* » (143), des tests de sécurité virale doivent être ajoutés aux tests indiqués dans la monographie 5.2.3 de la Pharmacopée Européenne « *Cell substrates for the production of vaccines for human use* ». En effet, comme pour toute contamination microbienne, toute contamination virale pourrait avoir de sérieuses conséquences lors de l'administration du produit fini au patient. Une telle contamination peut provenir des cellules utilisées, ou survenir au cours des étapes de production des rAAV. Les virus peuvent se retrouver dans les cellules des MCB ou des WCB par différents moyens :

- Lignées cellulaires obtenues à partir d'animaux ou humains infectés ;
- Utilisation de virus pour le développement de la lignée cellulaire ;
- Utilisation de réactifs biologiques contaminés (notamment le sérum) ;
- Contamination virale lors de la manipulation des cellules.

La sélection et le contrôle des matériels de départ, incluant les lignées cellulaires, font partie des approches permettant de maîtriser le risque viral et sont donc indispensables dans le cadre d'une production clinique de vecteurs viraux recombinants.

#### 3.1.4. Principales lignées cellulaires utilisées pour la production de rAAV

Deux lignées cellulaires sont principalement utilisées pour la production de rAAV : les cellules HeLa et les cellules HEK293 <sup>(144)</sup>. Ces deux lignées de cellules humaines permettent la réalisation des modifications post-traductionnelles qui ont lieu physiologiquement au niveau des capsides des rAAV <sup>(145)</sup>. Si les premières sont encore largement utilisées pour les étapes de recherche et développement, les cellules HEK293 sont les plus utilisées et font partie des rares lignées autorisées par la FDA pour la production clinique de vecteurs viraux. Elles ont été isolées à partir de reins d'embryons humains (HEK – *Human Embryonic Kidney*) au début des années 1970, et ont par la suite été transformées par un adénovirus humain de type Ad5 <sup>(146)</sup>. La présence de gènes issus de l'Ad5 dans le génome des cellules HEK293 a permis à ces dernières de produire de grandes quantités de protéines recombinantes <sup>(144)</sup>. De plus, elles peuvent être cultivées en procédé adhérent ou suspension, se divisent rapidement et peuvent être transfectées par différentes méthodes. Des kits de transfection incluant tous les réactifs nécessaires pour transfecter des cellules HEK293 sont d'ailleurs disponibles sur le marché. La lignée cellulaire HEK293T est une lignée dérivée des cellules HEK293, qui exprime le « large T antigen » du virus simien SV40. Cette lignée permet de produire de hauts titres en vecteurs viraux recombinants suite à leur transfection par des plasmides portant l'origine de répllication SV40 <sup>(147)</sup>. Bien que cette lignée cellulaire soit encore très fréquemment choisie pour le développement de vecteurs viraux, son utilisation est controversée et le développement de lignée aussi productives mais n'exprimant pas l'antigène T devient un enjeu de sécurité majeure. Ce point sera discuté en partie III.B.

### 3.2. Banques de plasmides ADN

A côté des banques cellulaires, les seconds « *starting materials* » critiques pour la production de vecteurs viraux recombinants sont les plasmides. Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires qui vont apporter d'une part, les séquences génétiques nécessaires à la formation des vecteurs, et d'autre part le transgène, qui sera responsable de l'effet thérapeutique du

médicament. A l'instar des cellules, les plasmides de par leur origine biologique, sont complexes à produire et à contrôler.

### 3.2.1. Principe de production et de contrôle des plasmides

Les plasmides sont produits selon un procédé de fermentation recombinant <sup>(148)</sup> (Figure 36). Ils sont le plus souvent amplifiés par des souches bactériennes ultraproductrices d'E.coli <sup>(149)</sup>. Le plasmide spécifiquement construit (contenant la séquence génétique d'intérêt) est introduit dans les cellules bactériennes par transformation. Les cellules ayant intégré le plasmide sont sélectionnées puis amplifiées. Les plasmides sont produits à l'intérieur des cellules bactériennes, et seront libérés à la suite d'une étape de lyse cellulaire. Ils sont ensuite récoltés et purifiés par une ou plusieurs étapes de chromatographie, afin d'éliminer les impuretés liées au produit et au procédé. Les plasmides sont ensuite formulés dans le tampon de formulation désiré puis répartis en flacons.

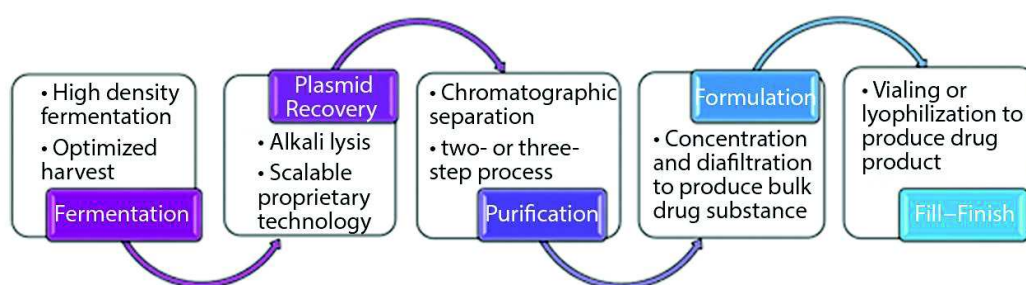


Figure 36 : Principe de production des plasmides <sup>(148)</sup>

Afin de permettre le stockage de plasmides à long terme, des banques glycérolées sont mises en place <sup>(150)</sup>, selon le même principe que les banques cellulaires précédemment décrites. Ces banques sont constituées des bactéries ayant intégré le plasmide que l'on cherche à produire, auxquelles est ajoutée une proportion définie de glycérol. Les cellules bactériennes ainsi protégées par le glycérol peuvent ensuite être congelées à -80°C pendant des années. Quand le besoin d'une quantité définie de plasmide est émis pour la production d'un lot de vecteurs viraux, un ou plusieurs flacons de la banque glycérolée sont décongelés. Les cellules bactériennes sont remises en culture et les plasmides sont récoltés et purifiés. Une banque glycérolée correspond à un plasmide ; ainsi dans les procédés basés sur une tri-transfection transitoire, 3 banques glycérolées seront nécessaires pour produire les 3 plasmides (pAAV, pHelper, pAd).

En tant que matériels de départ critiques, les plasmides sont soumis à une série de tests permettant de vérifier leur identité, qualité et pureté, avant de pouvoir être libérés et utilisés pour la production de vecteurs clinique ou commerciale. Les contrôles réalisés sur les plasmides doivent répondre au chapitre 5.2.12 de la Pharmacopée Européenne « Raw

materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products ». Parmi les tests réalisés, on retrouve la pureté et la concentration qui peuvent être analysées en spectrophotométrie UV, l'identité du plasmide qui peut être évaluée par une étape de séquençage génétique, la quantification d'acides nucléiques et de protéines résiduels, la quantification d'endotoxines et de micro-organismes...

#### 4. Etapes de culture cellulaire et production des rAAV (*upstream*)

Les matériels de départ critiques que sont les plasmides et les cellules vont être intégrés dans différentes étapes constituant un processus complexe, permettant à terme d'obtenir les vecteurs viraux recombinants. Les grandes étapes de production sont résumées dans la [Figure 37](#) ci-dessous.

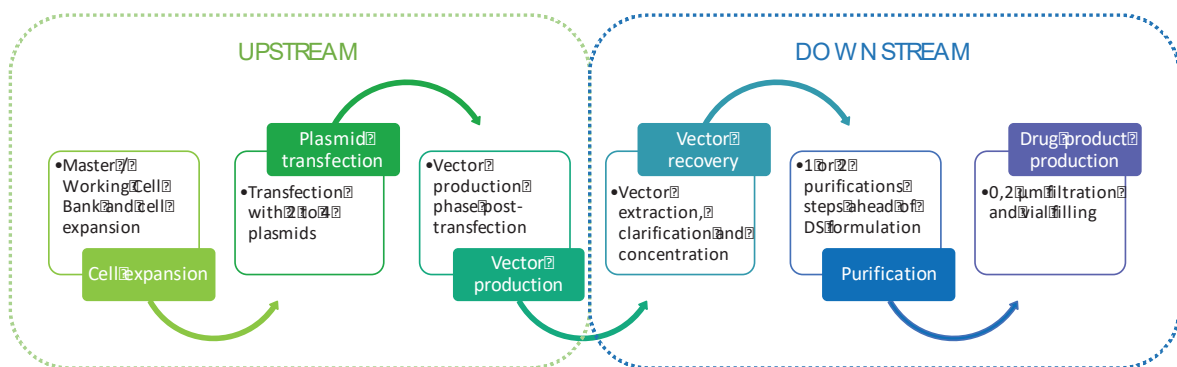


Figure 37 : Procédé de production de vecteurs viraux recombinants <sup>(151)</sup>

Les étapes « amont », communément appelées « upstream », consistent à décongeler une ou plusieurs ampoules issues de la banque cellulaire de travail, puis à entretenir et amplifier les cellules. Cette phase de culture et d'amplification cellulaire peut se faire selon un procédé adhérent ou un procédé en suspension. Au terme des étapes d'amplification cellulaires successives, le but est d'obtenir la concentration suffisante de cellules pour passer à l'étape de transfection. Cette dernière consiste à faire entrer les plasmides dans les cellules, permettant la production des vecteurs viraux.

##### 4.1. Culture de cellules adhérentes

La technique de culture de cellules adhérentes a été la première mise au point. Dans ce procédé, une monocouche de cellules adhère à la paroi au fond du flacon de culture, en général en polystyrène (ce qui permet l'observation des cellules au microscope). L'expansion cellulaire se fait donc en deux dimensions dans des CellStack ou Cell Factory qui peuvent aller jusqu'à 40 étages ([Figure 38](#)). Les cellules doivent être repiquées avant d'atteindre une confluence totale (la totalité de la paroi est alors recouverte de cellules), et le milieu de culture est changé à

chaque passage cellulaire. Cette technique de culture permet d'obtenir de bons titres en vecteurs, mais pose problème en termes d'augmentation d'échelle (ce point sera discuté en partie III.B).

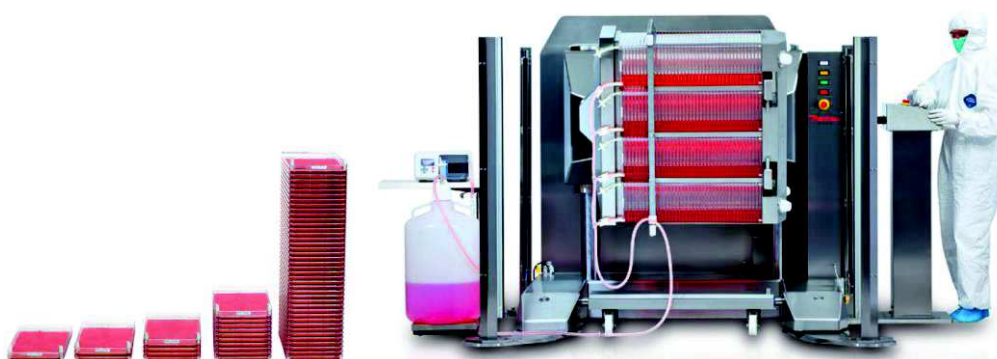


Figure 38 : flacons de culture de cellules adhérentes (152)

#### 4.2. Culture de cellules en suspension

Les procédés de culture cellulaire en suspension constituent une alternative intéressante face à la problématique d'augmentation d'échelle rencontrée avec les procédés adhérents. Les cellules ne poussent plus sur une surface horizontale mais en suspension dans un espace en trois dimensions, d'abord dans des « shake flasks » (erlens sous agitation), puis en bioréacteur, avec des paramètres de culture contrôlés (131). Des cellules issues de banques de cellules cliniques ont été adaptées à la culture en suspension, dans un milieu de culture sans composant animal et sans antibiotiques. La preuve de concept d'une production de rAAV en suspension et sans sérum a été décrite dès 2007 (153). Depuis, les procédés suspension permettent d'obtenir des rendements en vecteurs équivalents voire meilleurs que ceux obtenus avec les procédés adhérents (130).

Différents types de bioréacteurs peuvent être utilisés pour les procédés de culture cellulaire en suspension. Les STR (*Stirred-Tank Reactors*) sont constitués d'une cuve équipée d'un axe d'agitation qui permet le mélange et le gazage du milieu de culture et des cellules. Une tour de contrôle reliée au bioréacteur permet de contrôler les paramètres de culture (température, vitesse d'agitation, pourcentage de gaz, pH...). Ces équipements peuvent être utilisés avec des poches de culture à usage unique, qui sont éliminées à la fin de la production d'un lot. Sur le même principe, des poches adaptées aux « *wave bioreactors* » ont été développées. Dans ce cas la poche est posée sur un socle à bascule qui permet l'agitation de son contenu (Figure 39).



Figure 39 : à gauche un bioréacteur STR <sup>(154)</sup>, à droite un bioréacteur RM (rock motion) ou « wave bioreactor » <sup>(155)</sup>

### 4.3. Tri-transfection des cellules amplifiées

Après l'étape d'amplification cellulaire, les cellules sont transfectées par les différents plasmides nécessaires à la production des rAAV. L'efficacité de cette étape est critique pour obtenir une grande productivité en vecteurs. La productivité est mesurée en VG (*vector genome*) généré par cellule, et peut être très variable, allant de  $10^3$  à  $10^5$  VG par cellule (soit 0,006 à 0,6 pg par cellule). A titre de comparaison, les productivités obtenues lors de la fabrication de protéines recombinantes selon une méthode de transfection transitoire sont comprises entre 1,3 et 150 pg de protéine par cellule, soit un facteur 100 par rapport à la production de rAAV <sup>(133)</sup>. Cet écart peut être expliqué en partie par la cytotoxicité de certains gènes helper, et par l'inefficacité d'empaquetage des génomes dans les capsides nouvellement formées. En améliorant ces deux paramètres, la productivité pour les rAAV pourrait être multipliée par 10 <sup>(133)</sup>. Parmi les paramètres à optimiser pour obtenir une productivité satisfaisante, on peut citer la quantité de plasmides à transfecter, le choix de l'agent de transfection, le ratio entre les différents plasmides et le ratio entre la quantité totale d'ADN à transfecter et l'agent de transfection <sup>(130)</sup>. Les conditions et le milieu de transfection sont également à prendre en compte.

Les 3 méthodes de transfection les plus adaptées à la production à large échelle de rAAV sont :

- **La coprécipitation au phosphate de calcium** : cette méthode requiert généralement la présence de SVF dans le milieu de transfection, et son efficacité est très dépendante de différentes variables telles que la concentration en réactifs, le pH, la température et l'ordre d'ajout des différents réactifs <sup>(156)</sup>.

- **La coprécipitation au Polyéthylèneimine (PEI)** : le PEI linéaire de 25 kD est le plus utilisé, il permet la transfection de cellules en suspension dans du milieu sans sérum, des caractéristiques idéales pour l'augmentation d'échelle et la sécurité d'utilisation <sup>(156)</sup>.
- **L'utilisation de lipides cationiques** : ces agents de transfection sont très efficaces pour le transfert de gènes dans des cultures en suspension, mais leur prix reste un obstacle <sup>(156)</sup>.

Ces différents agents de transfection ont été décrits dans la partie I. En raison de son rapport coût/efficacité, le PEI reste à l'heure actuelle l'agent de transfection le plus utilisé, mais de nouveaux agents de transfusions sont développés afin de standardiser et d'améliorer l'efficacité de cette étape (voir partie III.B). Suite à l'étape de transfection par les différents plasmides, les cellules vont produire les vecteurs viraux recombinants portant le gène thérapeutique, qui seront ensuite purifiés.

## 5. Etapes de purification des rAAV (*downstream*)

### 5.1. Introduction

Les étapes « aval » du procédé, plus connues sous le nom de « downstream », désignent les étapes de purification successives auxquelles sont soumis les vecteurs recombinants produits lors des étapes « upstream ». L'objectif final est d'obtenir un produit de titre élevé, de haute pureté et de haute activité. Les vecteurs doivent être récupérés à partir d'importants volumes liés aux étapes d'amplification cellulaire, et être séparés des impuretés liées au procédé (débris cellulaires, ADN résiduels...) ainsi que des impuretés liées au produit (notamment les capsides vides) <sup>(157)</sup>. L'élimination de ces impuretés est critique d'un point de vue sécurité et efficacité : certaines impuretés peuvent provoquer des réactions immunitaires lors de l'administration aux patients. Des réactions immunitaires mettant en jeu les lymphocytes T cytotoxiques ont notamment été mises en évidence, entraînant une diminution de l'expression du transgène <sup>(158)</sup>. Les propriétés biologiques et physicochimiques des vecteurs viraux pouvant varier selon le sérotype, il est difficile de mettre au point un procédé de purification standardisé. Actuellement, celui-ci doit être adapté et optimisé pour chaque type de vecteur produit, d'autant plus que la stabilité et l'activité des vecteurs purifiés peuvent être modifiées en fonction des méthodes de production, de purification et du tampon de formulation choisi <sup>(131)</sup>. Toutefois, les grandes étapes de purifications se retrouvent d'un procédé à l'autre, les variations résident dans les équipements/systèmes utilisés et les paramètres du procédé.

## 5.2. Récolte des cellules, lyse cellulaire et benzonase

Les rAAV produits après transfection sont principalement présents à l'intérieur des cellules productrices. Après la phase de production des vecteurs, les cellules productrices sont récoltées et lysées afin de libérer les particules virales intracellulaires. A l'échelle industrielle, une technique de lyse chimique est employée : les cellules sont détruites sous l'action d'agents chimiques ayant des propriétés détergentes, tels que le Tween ou le Triton (voir partie III.B). Les acides nucléiques résiduels (cellulaires ou plasmidiques) sont ensuite détruits sous l'action de la benzonase, qui possède une activité enzymatique de nucléase <sup>(131)</sup>. Les vecteurs devront donc être séparés des débris cellulaires et acides nucléiques résiduels présents en suspension dans le milieu, par une étape de filtration ou clarification. Cette étape permet également de diminuer le volume de récolte avant la réalisation des étapes de purification suivantes. La récolte est passée à travers des filtres de clarification laissant passer les vecteurs recombinants, et retenant les débris cellulaires et d'éventuelles cellules non lysées. Pour cette étape de filtration clarifiante, l'utilisation de cartouches de filtration à usage unique est répandue et permet d'éviter leur colmatage <sup>(133)</sup> <sup>(42)</sup>.

## 5.3. Etapes de chromatographie

Suite à la lyse cellulaire et à la séparation des vecteurs et des plus gros débris cellulaires, une ou plusieurs étapes de chromatographie vont permettre d'augmenter la pureté du produit. Les chromatographies d'affinité et d'échange d'ions sont les plus utilisées pour la purification de vecteurs viraux rAAV, de par leur efficacité, adaptabilité et possibilité de scale-up <sup>(131)</sup>. La chromatographie d'affinité repose sur l'attachement des particules virales à un substrat mimant les récepteurs cellulaires des virus natifs. La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur les interactions électrostatiques entre la capsid des rAAV et des groupements ionisés présents dans la phase stationnaire de la colonne de chromatographie. Dans les deux cas, les particules virales liées à la matrice / phase stationnaire sont éluées en augmentant la force ionique de la phase mobile. Toutefois, les différences de propriétés physicochimiques entre les sérotypes de rAAV impliquent une optimisation spécifique à chaque sérotype.

### 5.3.1. Chromatographie d'affinité

Si l'étape de clarification post-récolte permet principalement d'éliminer les impuretés liées au procédé, l'enjeu des étapes de chromatographie est d'éliminer les impuretés liées au produit. La chromatographie d'affinité repose sur les interactions spécifiques entre un ligand et son substrat (la molécule à isoler). La principale application industrielle de cette technique est la purification des anticorps monoclonaux, dont le ligand est la protéine A <sup>(159)</sup>. Cette technique permet une purification plus sélective des rAAV, en fonction des protéines présentes sur les



capsides des différents sérotypes de vecteurs. Différents types de résines d'affinité sont commercialisées, et sont souvent coûteuses car le procédé de fabrication des ligands est complexe. Par exemple, les résines POROS™ Capture Select™ commercialisées par ThermoFisher Scientific ont été développées pour la purification d'AAV8 et AAV9. La technologie POROS™ Capture Select™ est basée sur l'utilisation en tant que ligands de fragments d'anticorps constitués d'un seul domaine de chaîne lourde (V<sub>H</sub>H). Ces fragments représentent la plus petite unité fonctionnelle de liaison à un antigène des anticorps de certains camélidés tels que le lama <sup>(160)</sup> (Figure 40).

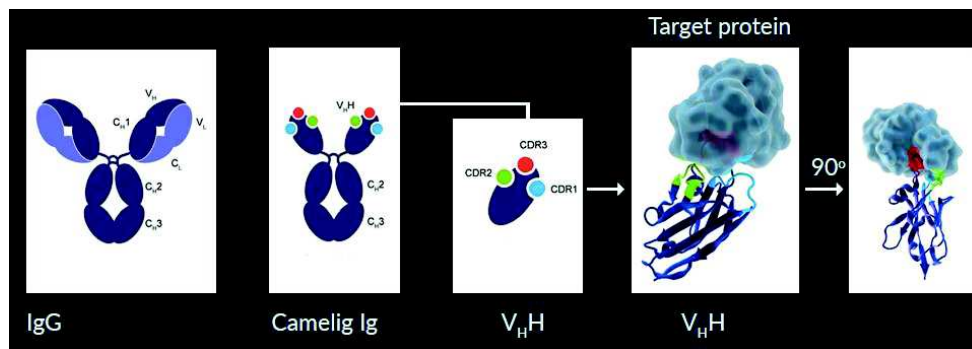


Figure 40 : Comparaison entre une IgG humaine et un anticorps de camélidé <sup>(160)</sup>. La « target protein » (protéine cible) peut représenter le vecteur rAAV à purifier.

Ces fragments V<sub>H</sub>H sont compacts, extrêmement spécifiques et résistants aux conditions extrêmes rencontrées pendant une étape de chromatographie. Après sélection du ligand le plus affin pour tel ou tel sérotype de vecteur, les ligands sont produits en grande quantité par des levures (*S. cerevisiae*) <sup>(160)</sup>. Ces ligands sont fixés sur des microbilles de 50 µm. Le principe de purification est présenté dans la Figure 41.

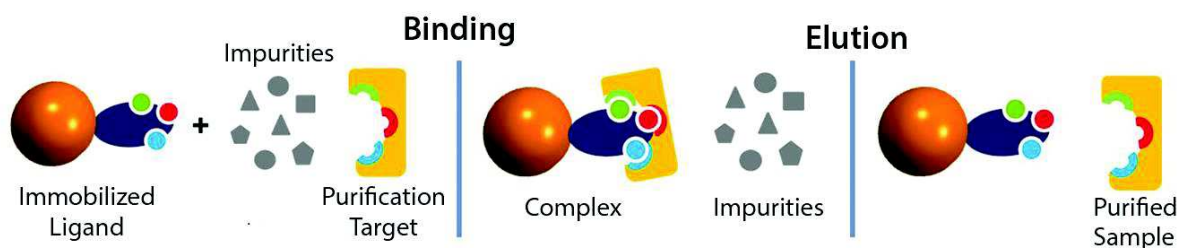


Figure 41 : Principe de purification des rAAV par la résine POROS™ <sup>(161)</sup>

### 5.3.2. Chromatographie échangeuse d'ions

Parmi les impuretés à éliminer se trouvent les capsides vides, ne contenant pas le gène thérapeutique. Celles-ci peuvent diminuer l'efficacité du médicament de thérapie génique par phénomène de compétition avec les capsides pleines, et provoquer des réactions immunitaires lors de l'injection au patient. La chromatographie d'affinité ne permet pas de séparer les capsides vides et les capsides pleines. A petite échelle, elles peuvent être séparées par la

technique de centrifugation en gradient de densité au chlorure de césium ou à l'iodixanol <sup>(162)</sup>. Cependant cette technique n'est pas adaptée à une échelle industrielle ni aux Bonnes Pratiques de Fabrication. Une étape de chromatographie échangeuse d'ions est une bonne alternative pour séparer les capsides vides des capsides pleines (cf partie III.B). En effet, la présence d'ADN encapsidé dans les particules virales peut modifier légèrement le point isoélectrique (pI) des particules virales <sup>(159)</sup>. Le mécanisme de séparation serait ainsi lié à une densité de charges négatives légèrement augmentée pour les vecteurs contenant de l'ADN, par rapport aux capsides vides. La différence de pI étant très faible (0,4 unités), une résine échangeuse d'ions de haute résolution doit être utilisée. A ce jour la chromatographie échangeuse d'anions est la seule méthode décrite permettant de séparer les capsides vides des capsides pleines <sup>(123)</sup>.

#### 5.4. Ultrafiltration (concentration) & diafiltration

Le procédé de purification est généralement complété par des étapes d'ultrafiltration et diafiltration, qui permettent respectivement de concentrer les vecteurs et dialyser le tampon. Ces deux étapes se déroulent successivement. La technique la plus utilisée est la filtration tangentielle (*tangential flow filtration* ou TFF), basée sur une séparation des particules virales par leur taille. Cette méthode de filtration est largement utilisée dans l'industrie des bioprocédés <sup>(133)</sup>. Les systèmes les plus utilisés en TFF sont les fibres creuses et les cassettes d'ultrafiltration. Les vecteurs rAAV sont largement plus gros que la plupart des protéines solubles et autres impuretés potentiellement présentes dans la récolte : la masse de leur capside serait supérieure à 600 kDa <sup>(163)</sup>. Ainsi, en choisissant un système de filtration tangentielle avec un seuil de rétention de 100 kDa, une concentration des vecteurs d'un facteur supérieur à 100 peut être obtenue <sup>(164)</sup>. Sous l'effet de la pression transmembranaire appliquée, les vecteurs sont retenus par la fibre creuse dans le rétentât, alors que les débris et autres impuretés sont éliminés dans le perméât (Figure 42).

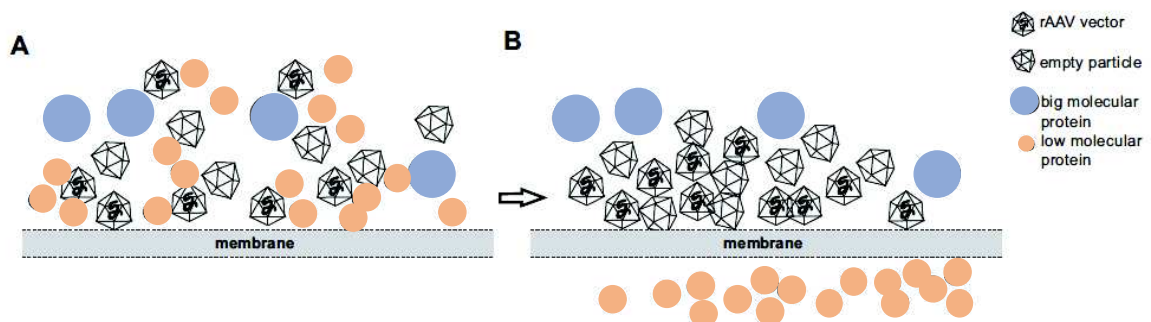


Figure 42 : Principe de la filtration tangentielle des rAAV <sup>(163)</sup>

L'étape de TFF permet également de dialyser le tampon : à l'issue de cette étape, les vecteurs se trouveront dans leur tampon de formulation final. Le tampon d'élution de l'étape de

chromatographie précédente est remplacé par le tampon de formulation final des rAAV. Les excipients présents dans le tampon de formulation doivent permettre la stabilité du produit dans les conditions de stockage prévues, et être compatibles avec la voie d'administration choisie <sup>(165)</sup>. Les excipients peuvent permettre également d'éviter le phénomène d'agrégation qui peut survenir : certains sérotypes d'AAV (tels que les AAV2) ont tendance à s'agréger lorsque le vecteur est concentré <sup>(166)</sup>. Ce phénomène doit être évité car il peut altérer la biodistribution du vecteur dans l'organisme et augmenter son immunogénicité lors de l'administration chez le patient. Par ailleurs, un phénomène d'adsorption non spécifique des vecteurs par le matériau du contenant primaire (verre, plastique, métal...) peut survenir, lors du stockage ou de la manipulation <sup>(133)</sup>. L'ajout d'un surfactant (tensioactif) tel que le Pluronic à très faible concentration (0,001%) dans le tampon de formulation permet de prévenir ce phénomène et donc la perte potentielle de vecteur <sup>(167)</sup>.

De nombreux systèmes de filtration tangentielle sont disponibles et se différencient par la nature de leurs membranes, la surface de leurs filtres et leurs seuils de rétention. Des systèmes automatisés permettant de contrôler la pression transmembranaire et le facteur de concentration souhaité peuvent être utilisés afin de fiabiliser cette étape, et facilitent l'augmentation d'échelle <sup>(168)</sup>. Dans le cadre de la maîtrise des contaminations, les dispositifs TFF sélectionnés sont à usage unique.

## 6. Remplissage et finition

### 6.1. Répartition aseptique

Après l'étape d'ultrafiltration/diafiltration, les vecteurs rAAV se trouvent dans leur tampon de formulation final. Le produit « vrac » (Drug Substance – DS) obtenu à la fin des différentes étapes de purification doit être réparti dans son contenant final (Drug Product – DP). Cette étape de répartition aseptique, précédée d'une étape de filtration stérilisante, permettra d'obtenir le produit fini ; elle doit être réalisée dans des locaux et avec des équipements adaptés tels que des isolateurs de répartition (de classe A). Le processus de remplissage doit être validé <sup>(169)</sup>. Différents systèmes de répartition aseptique existent et sont mis en place en fonction de la taille des lots à répartir : la répartition peut être manuelle, semi-automatique ou automatique. Dans le cas des médicaments injectables stériles produits à grande échelle, tels que les vaccins ou les anticorps monoclonaux, la répartition du produit dans le conditionnement primaire est le plus souvent automatisée, permettant une cadence de plusieurs milliers de flacons par heure <sup>(170)</sup>. Bien que l'automatisation de l'étape de répartition aseptique permette une meilleure reproductibilité et une diminution du risque d'erreur humaine (notamment en termes de volume réparti et de qualité microbiologique), elle n'est

pas toujours possible ou pertinente. Dans le cas de la production de lots cliniques de médicaments de thérapie génique, les volumes de produit à répartir, de l'ordre d'une centaine de contenants, sont bien inférieurs à ceux représentés par les vaccins ou les anticorps monoclonaux. Ainsi, pour des lots de petite taille avec un volume de l'ordre du litre à répartir, la répartition sera manuelle ou semi-automatique.

La répartition manuelle consiste à prélever un volume de produit à l'aide d'une distributrice manuelle, puis à transférer la totalité ou une partie du volume dans le conditionnement primaire, en général un flacon. Les flacons sont ensuite bouchés puis sertis et subissent un test d'intégrité. La répartition semi-automatique se fait à l'aide de pompes qui vont permettre de transférer une solution d'un contenant à un autre (flacon, poche ou seringue) <sup>(170)</sup>. Ces équipements constituent une alternative intéressante au processus de répartition manuelle, car ils sont facilement intégrables dans un isolateur déjà en place. Ils permettent d'améliorer la précision des volumes délivrés, de gagner en productivité et de sécuriser les productions. Il existe deux types de pompes : les pompes volumétriques et les pompes péristaltiques (Figure 43). Les premières sont constituées de pousse-seringues contrôlées par un moteur, elles permettent donc de remplir une ou plusieurs seringues à la fois. Les secondes sont constituées d'une tête de pompe permettant de transférer le liquide d'un contenant à un autre.



*Figure 43 : Photos de semi-automates de répartition  
A gauche : Pompe volumétrique Mibmix® (Hemedis) <sup>(171)</sup>  
A droite : Pompe péristaltique Vantage 3000® (Verderflex) <sup>(172)</sup>*

Certaines compagnies proposent des systèmes de remplissage et de fermeture de flacons en conditions aseptiques, permettant de s'affranchir des étapes de bouchage et sertissage des flacons. C'est le cas par exemple de la technologie *Crystal® closed vials* proposée par Aseptic Technologies, mise au point au début des années 2000. Ce système permet le remplissage de flacons fermés stérilisés « *ready-to-fill* » en 3 étapes (Figure 44) : une aiguille vient percer le bouchon et dispense le produit dans le flacon ; la trace de ponction laissée par l'aiguille est

refermée par un laser, puis le bouchon en plastique est fixé par simple pression au-dessus du stopper <sup>(173)</sup>.

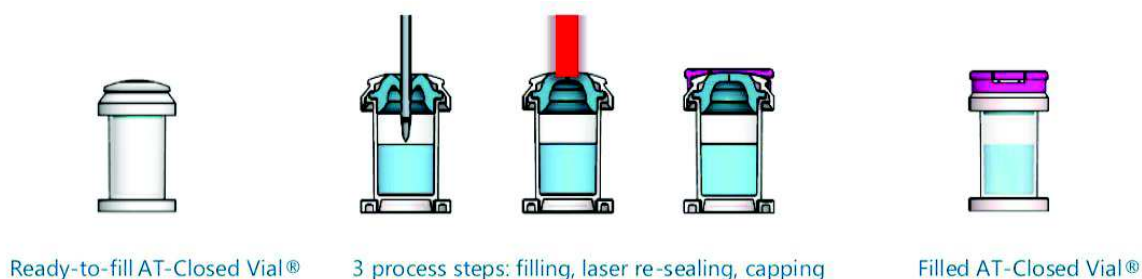


Figure 44 : Principe du fonctionnement de la technologie Crystal® closed vials <sup>(173)</sup>

Ce système permet de diminuer le risque de contamination du produit, est facile à manipuler et assure 100% d'intégrité des flacons. Il peut être utilisé en répartition manuelle ou automatique.

## 6.2. Mirage

Les flacons répartis doivent ensuite subir une étape de mirage, obligatoire pour les produits injectables <sup>(111)</sup>. Cette étape d'inspection visuelle permet de s'assurer de la bonne qualité des produits au niveau macroscopique (absence de particule, couleur et volume conformes, etc) <sup>(174)</sup>. Cette étape est sujette à la même problématique de taille de lot que l'étape de répartition : elle peut être automatique pour des lots de taille importante (plusieurs milliers d'unités à mirer), ou être manuelle ou semi-automatique pour des plus petits lots (quelques centaines d'unités à mirer). En mirage automatique, les unités sont inspectées par des caméras, capables de fournir une quantité d'images par seconde de plus en plus grande. En mirage semi-automatique, les unités à mirer sont placées par un automate, mais c'est l'œil humain qui les inspecte. Les méthodes manuelle et semi-automatique requièrent donc une très bonne acuité visuelle des opérateurs ; les principales limites associées sont la baisse de concentration et la fatigabilité du personnel.

L'étape de mirage termine le procédé de fabrication des médicaments de thérapie génique, qui vont ensuite être stockés à -70°C ou directement utilisés chez les patients.

## **Partie B : les enjeux de la production industrielle des vecteurs viraux rAAV**

Les vecteurs rAAV étant utilisés dans un nombre croissant d'essais cliniques, leur production en quantités suffisantes et selon les qualités requises est un enjeu majeur pour le développement de nouveaux médicaments de thérapie génique. Si les méthodes de production tendent à s'industrialiser de plus en plus, certaines étapes restent manuelles, difficilement standardisables et peu adaptées au scale-up. Or cette montée d'échelle est indispensable car de plus en plus de médicaments de thérapie génique seront mis sur le marché dans les années à venir. Les efforts doivent être orientés vers le développement de plateformes de production robustes, pouvant supporter les phases de commercialisation <sup>(131)</sup>.

Certaines problématiques ont été mentionnées dans la partie précédente (III.A), qui présente le procédé de production des vecteurs viraux. Les différents enjeux peuvent être séparés en 3 groupes : les enjeux liés à la sécurité, qui concernent principalement les matières premières et matières de départ mises en jeu dans le procédé de fabrication ; les enjeux liés à l'efficacité du procédé et du produit ; et enfin ceux liés à la qualité et au coût, qui rejoignent l'idée d'une standardisation du procédé.

### **1. Enjeux « sécurité »**

#### **1.1. Des procédés sans matière d'origine animale**

Comme décrit dans la partie II (paragraphe 2.2.2), l'utilisation de matières premières d'origine animale est associée au risque de transmission d'encéphalopathies spongiformes ; elles présentent donc un risque pour le produit et pour le patient. Ces matières premières regroupent par exemple les milieux de culture cellulaire supplémentés en sérum de veau fœtal (SVF), utilisé depuis les années 1960 pour la production in vitro de cellules, ainsi que certaines enzymes telles que la trypsine, utilisée pour décoller les cellules des flasques de culture dans les procédés adhérents <sup>(175)</sup>. A l'origine, la technique de production industrielle de cette enzyme était une extraction à partir de pancréas de porcs. Concernant le SVF, le procédé de production est de récupérer le sang du fœtus de façon aseptique par ponction cardiaque, puis le sang est laissé à sédimenter et est centrifugé afin de ne récupérer que le sérum. En plus du risque de transmission TSE/BSE, ces matières d'origine animale présentent l'inconvénient d'une composition mal connue. Afin de s'affranchir de ces deux problématiques, des recherches visant à mettre au point des milieux de culture sans sérum ou des substituts de sérum synthétiques ont été menées. Malgré ces efforts, le SVF est toujours largement utilisé dans les

procédés de culture adhérents. Le développement de lignées cellulaires adaptées à une croissance en suspension a permis de mettre au point des milieux de culture chimiques de composition définie, permettant de s'affranchir de la problématique TSE/BSE présentée dans la partie II.

## 1.2. Des agents de lyse cellulaire plus écologiques

Un des agents de lyse cellulaire le plus fréquemment utilisé est le Triton™ X-100 (ou 4-nonylphénol, cf [Figure 45](#)), un surfactant non-ionique et non dénaturant permettant de solubiliser les protéines <sup>(176)</sup>. Il permet donc de détruire les membranes cellulaires et ainsi de libérer les rAAV produits par les cellules, présents dans leur cytoplasme. De par sa nature, le Triton™ X-100 est donc une matière chimique devant répondre à la réglementation REACH « Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals ». Ce règlement de l'Union Européenne est entré en vigueur le 1<sup>er</sup> juin 2007 dans un objectif de protection de la santé humaine et de l'environnement contre les risques liés aux substances chimiques. Son périmètre comprend donc l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques.

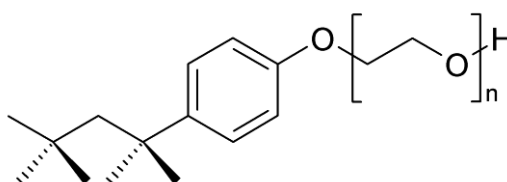


Figure 45 : Structure du Triton X-100

Les substances chimiques pouvant présenter un risque pour la santé et/ou l'environnement font l'objet de restrictions, qui consistent à « limiter ou à interdire la fabrication, la mise sur le marché (y compris l'importation) ou l'utilisation d'une substance » ou « imposer des conditions pertinentes, comme des mesures techniques ou des étiquetages spécifiques » <sup>(177)</sup>. En particulier, l'annexe XIV du règlement REACH inclut une liste des substances soumises à autorisation. Le Triton™ X-100 fait partie de la famille chimique des alkylphénol ethoxylates, qui a été ajoutée à l'annexe XIV le 14 juin 2017, à cause de ses propriétés perturbant le système endocrinien <sup>(178)</sup>. A cet effet, le Triton a été interdit d'utilisation sur le sol européen à compter du 4 janvier 2021. Les entreprises souhaitant continuer à utiliser cette substance doivent donc déposer un dossier de demande d'autorisation auprès de l'ECHA (European Chemicals Agency). Afin de s'affranchir de cette contrainte, les industriels et les fournisseurs se tournent vers des agents de lyse plus « écologiques » pouvant remplacer le Triton. A titre d'exemple, le Tergitol™ 15-S-7, un surfactant biodégradable, ou encore le Tween® 80, sont deux agents de lyse non ioniques qui peuvent remplacer le Triton actuellement utilisé <sup>(176)</sup>.

### 1.3. Des lignées cellulaires plus sûres

Comme décrit dans la partie III.3.1.4, la lignée cellulaire HEK293T est largement utilisée pour la production de vecteurs viraux, car elle offre par rapport à la lignée parentale HEK293 les avantages suivants <sup>(179)</sup> :

- Une meilleure productivité en vecteurs ;
- Une meilleure cinétique de croissance cellulaire ;
- Une meilleure efficacité de transfection.

La lignée HEK293T a été obtenue par transfection de la lignée HEK293 avec un plasmide codant pour le SV40 « large T antigen ». Cet antigène est une protéine impliquée dans la réplication virale et l'induction du processus de transformation cellulaire. Elle présente une potentielle activité oncogénique en altérant les points de contrôle du cycle cellulaire <sup>(180)</sup>. Malgré son importante capacité de production, l'utilisation de la lignée HEK293T pour la production clinique de vecteurs viraux est donc controversée d'un point de vue sécurité. En effet, il existe un risque d'empaquetage de la séquence du « large T antigen » dans les vecteurs recombinants, et donc un risque de transmettre cette séquence potentiellement oncogène au patient lors de l'administration du produit <sup>(149)</sup>. Selon le « Guidance for human gene therapy investigational new drug applications » de la FDA, si des cellules présentant un phénotype tumorigène (telles que les HEK293T) sont utilisées pour la production de vecteurs viraux, les quantités d'ADN résiduels issus des cellules doivent être limitées pour assurer la sécurité du produit. Il est donc nécessaire de contrôler cette quantité dans le produit fini. De plus, il faudrait quantifier les séquences potentiellement oncogènes afin de limiter l'exposition du patient à ce risque <sup>(179)</sup>.

Afin de répondre à cette problématique de sécurité liée à l'antigène T, des lignées cellulaires sans antigène T ont été développées. Une des stratégies a été de déléter la séquence codant pour l'antigène T grâce à l'outil de biologie moléculaire CRISPR/Cas9 <sup>(179)</sup>. Les tests de productivité de rAAV réalisés sur cette lignée « non T » n'ont pas montré de différence significative par rapport aux résultats obtenus avec la lignée HEK 293T ; en revanche, les cellules de la lignée « non T » poussaient moins vite que les cellules HEK293T.

## 2. Enjeux « efficacité »

Les doses de vecteurs administrées aux patients lors des essais cliniques sont exprimées en VG (*vector genome*) par kilogramme, et dépendent donc du poids des patients. Elles sont comprises entre  $10^{11}$  et  $10^{14}$  VG par patient, en fonction des aires thérapeutiques <sup>(129)</sup> (les maladies orphelines requièrent souvent des doses élevées). Or avec les procédés de production actuels, la productivité atteinte dans le meilleur des cas est d'environ  $10^5$  VG par cellule <sup>(160)</sup>, soulevant la question de la capacité des fabricants à produire les quantités de vecteurs



nécessaires pour des essais cliniques, aussi bien dans les maladies rares concernant un nombre restreint de patients, que dans les indications plus larges telles que les cancers. En effet, en tenant compte de la baisse de rendement en produit au cours des étapes de purification, il apparaît indispensable i) d'une part, d'augmenter l'échelle de production et ii) d'autre part, d'augmenter le titre en vecteurs pour répondre à la demande. Les deux leviers principaux permettant cette augmentation sont décrits ci-après.

## 2.1. Amélioration de l'efficacité de l'étape de transfection

La méthode la plus utilisée actuellement pour la production de rAAV est la transfection de cellules HEK293 par trois plasmides différents (Tg, helper, Rep/Cap). L'entrée dans les cellules de ces 3 plasmides est indispensable pour permettre une production efficace de vecteurs recombinants. L'efficacité de l'étape de transfection est donc critique pour obtenir une grande productivité en vecteurs. Le but est de toucher le plus de cellules possibles, et ce de manière reproductible afin d'avoir un rendement constant entre les lots. Les deux limites majeures avec les agents de transfection actuels sont une faible efficacité sur les cellules en suspension, associée à une importante cytotoxicité <sup>(181)</sup>. Il est donc nécessaire de mettre au point des agents de transfection qui permettent :

- D'augmenter les rendements en vecteurs
- D'assurer un scale-up facile
- D'améliorer la reproductibilité entre les lots
- D'être conforme aux requis qualité et réglementaire pour la production GMP

Dans ce but, plusieurs entreprises ont développé de nouveaux agents de transfection pouvant répondre à ces critères. C'est le cas par exemple du FectoVIR®-AAV, mis au point par la société Polyplus-transfection <sup>(182)</sup>. Cet agent sans composant d'origine animale a été spécialement développé pour la production en suspension à grande échelle. Des tests de productivité ont montré que le FectoVIR®-AAV permettait d'obtenir des titres en vecteurs environ 3 fois plus élevés que ceux obtenus avec le PEI-Pro® (un des agents de transfection les plus utilisés), sans impacter la viabilité des cellules. De plus, il permet d'utiliser un volume d'agent de transfection limité : habituellement le volume du complexe de transfection représente 10% du volume de culture, ce qui est problématique lors du scale-up. Par exemple pour un lot de production à l'échelle 200L, il faudrait 20L de complexe de transfection. Avec le FectoVIR®-AAV ce volume est diminué à 1% du volume de récolte, ce qui correspondrait à 2L de complexe de transfection pour un procédé à l'échelle 200L <sup>(183)</sup>. Par ailleurs, le FectoVIR®-AAV est assez flexible puisqu'il a montré peu de variabilité de production au cours de tests réalisés sur 5 milieux de culture différents <sup>(184)</sup>. Cet agent de transfection semble donc adapté au principe de « plateforme de production » (cf paragraphe III.B.3) ; une version GMP-compliant est attendue pour le

deuxième semestre 2021. Un autre exemple est le polymère PTG1-Plus, développé par la société Polythéragène. L'efficacité du PTG1-Plus a été testée en comparaison avec le PEIpro, avec plusieurs sérotypes de vecteurs et différents transgènes, en partant d'une échelle 2L jusqu'à 200L. A l'instar du FectoVIR®-AAV, le PTG1-Plus a montré de meilleurs titres en vecteurs que le PEIpro, ainsi qu'un meilleur rendement en capsides pleines (cf paragraphe suivant) <sup>(181)</sup>. Toutefois, l'efficacité de ces nouveaux agents de transfection est nuancée par leur prix : à titre d'exemple, le PTG1-Plus est 300 fois plus onéreux que le PEIpro.

## 2.2. Enrichissement du produit en capsides pleines

Lors de la réplication naturelle des AAV dans le corps humain, le virus ne se réplique qu'en présence d'un adénovirus dans la même cellule infectée (cf paragraphe 1.2.2.5). La plupart des particules virales produites transportent le génome de l'AAV <sup>(185)</sup>. Cependant, dans le cas de la production de vecteurs rAAV avec la méthode de transfection plasmidique transitoire, de nombreuses particules virales sans génomes, appelées capsides vides, sont générées. Pour certains sérotypes d'AAV, parfois seules 5% des vecteurs contiennent le génome et donc le gène thérapeutique. Les capsides vides présentent deux problématiques principales :

- Une proportion très importante de vecteurs n'aura pas l'effet thérapeutique escompté, ce qui pourrait conduire à augmenter la dose en vecteurs à administrer au patient ;
- L'injection de capsides vides peut être associée à une réaction immunitaire du patient, entraînant des effets indésirables ainsi qu'une baisse d'efficacité du médicament.

Il apparaît donc primordial, non seulement d'augmenter la proportion de capsides pleines pour améliorer l'efficacité du médicament de thérapie génique, mais également de pouvoir contrôler le ratio de capsides vides/pleines, afin de libérer des produits reproductibles et ainsi éviter le risque d'obtenir des résultats cliniques variable d'un patient à l'autre, en fonction du lot de vecteur utilisé.

### 2.2.1. Etape de chromatographie échangeuse d'ions

Actuellement la principale réponse à la problématique « capsides vides » se trouve du côté downstream, avec l'ajout d'une étape de chromatographie échangeuse d'ions <sup>(186)</sup>. La difficulté est de parvenir à séparer deux choses très similaires : les capsides vides et pleines ont globalement les mêmes propriétés physicochimiques et la même taille. Leur densité étant légèrement différente, une séparation par ultracentrifugation est possible mais complètement inenvisageable pour un procédé industriel à grande échelle. La présence d'ADN dans les capsides pleines leur confère une charge négative un peu plus élevée que les capsides vides. Il est donc possible de les séparer grâce à une étape de chromatographie échangeuse d'anions. Le principe de l'élution est d'augmenter progressivement la conductivité ; la fraction contenant

les capsides vides sort en premier, puis la fraction contenant les capsides pleines sort en second. Le but serait donc de réaliser une chromatographie d'affinité pour récupérer les capsides (vides et pleines), et ensuite une chromatographie échangeuse d'anions afin d'enrichir le produit en capsides pleines. Différents systèmes de chromatographie échangeuses d'ions peuvent être utilisés : résines, membranes, monolithes... <sup>(186)</sup>. Par exemple, la résine Capto™ Q ImpRes de Cytiva ou la membrane Mustang® Q de Pall peuvent être utilisées pour les procédés de production à grande échelle.

### 2.2.2. Modification de la méthode de transfection : exemple du système TESSA

Une autre possibilité pour augmenter la proportion de capsides pleines est d'agir dès l'étape de transfection. Comme décrit à la page précédente, en cas de co-infection des cellules par un virus helper (qui peut être un adénovirus ou un herpes virus par exemple), la quasi-totalité des particules virales produites sont des capsides pleines <sup>(185)</sup>. Dans le cas de la tri-transfection, toutes les cellules ne reçoivent pas les 3 plasmides, résultant en la formation de capsides vides. Ce principe est schématisé en [Figure 46](#).

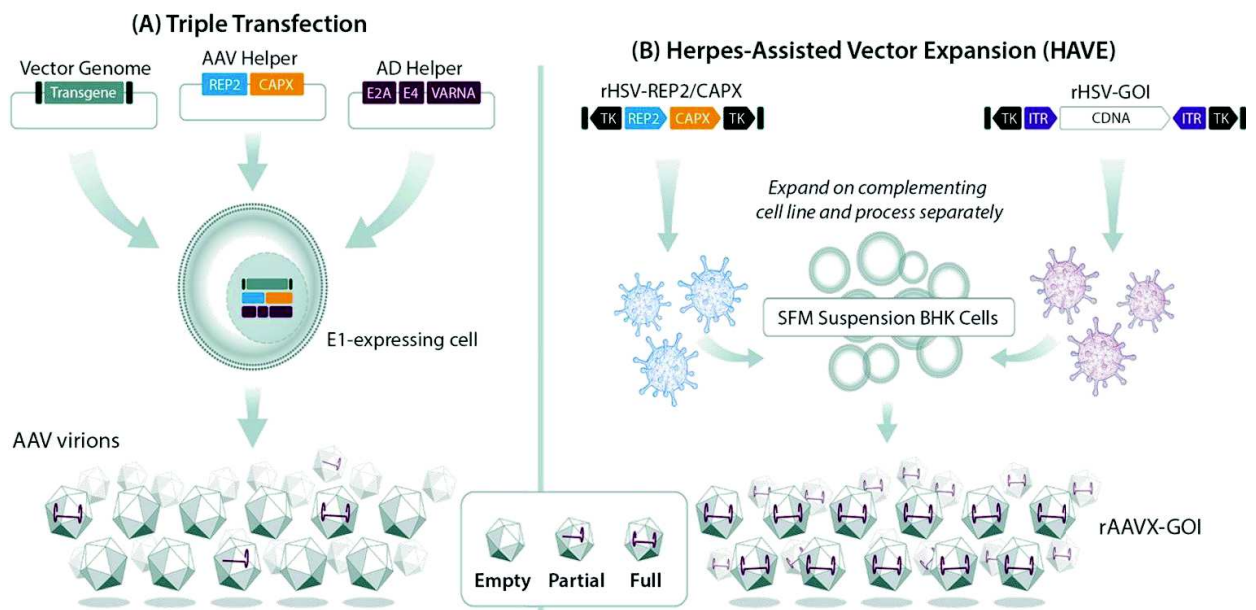


Figure 46 : Comparaison de la formation de capsides vides : transfection VS infection <sup>(187)</sup>

L'idée serait alors d'apporter la fonction helper non pas par un plasmide portant les gènes helper, mais par une infection des cellules par le virus helper. Toutefois, cette méthode est peu utilisée car elle est associée à une production concomitante de rAAV et d'adénovirus, ces derniers étant des impuretés à éliminer lors des étapes de purification. Pour répondre à ce problème, la société Oxgene a mis au point TESSA (*Tetracycline Enabled Self Silencing Adenovirus*), un virus helper modifié incapable de se répliquer <sup>(185)</sup>. Ce système permet donc

d'augmenter la proportion de capsides pleines tout en évitant la production d'adénovirus. Des tests sur le sérotype AAV2 ont montré une proportion de capsides pleines de 5% avec le procédé de tri-transfection (soit une particule virale sur 1200), et ce pourcentage est passé à 70% avec le système TESSA (soit une particule virale sur 6). Ce dernier présente d'autres avantages qui seront décrits dans les paragraphes suivants.

### 3. Enjeux « coûté/qualité »

L'accélération de l'évolution dans le domaine de la thérapie génique depuis la mise sur le marché des premiers médicaments, ainsi que la mise en place de procédures réglementaires facilitées (« PRIME » en Europe, « RMAT » et « Breakthrough designation » aux USA) menant rapidement aux essais cliniques entraînent une forte augmentation de la demande de production BPF de vecteurs de thérapie génique <sup>(188)</sup>. Or 80% des candidats médicaments sont développés par des start-up ou des laboratoires académiques qui n'ont pas les moyens ou ressources pour produire des lots BPF. Les procédés issus du monde de la recherche académique posent des problématiques en termes de qualité, de reproductibilité et d'augmentation d'échelle <sup>(189)</sup>. Du côté des industriels, de nombreux équipements actuellement utilisés proviennent du domaine des anticorps monoclonaux et ont été reconvertis pour convenir au procédé de fabrication des vecteurs viraux. Les procédés de production sont encore peu standardisés : différents types de vecteurs, de sérotypes, de lignées cellulaires, de procédés de culture, d'étapes de purification... Face à ce constat, une rupture technologique est nécessaire et deux enjeux majeurs doivent être pris en considération :

- **Augmenter l'échelle** pour répondre à la demande
- **Standardiser le procédé** pour maîtriser les coûts de production

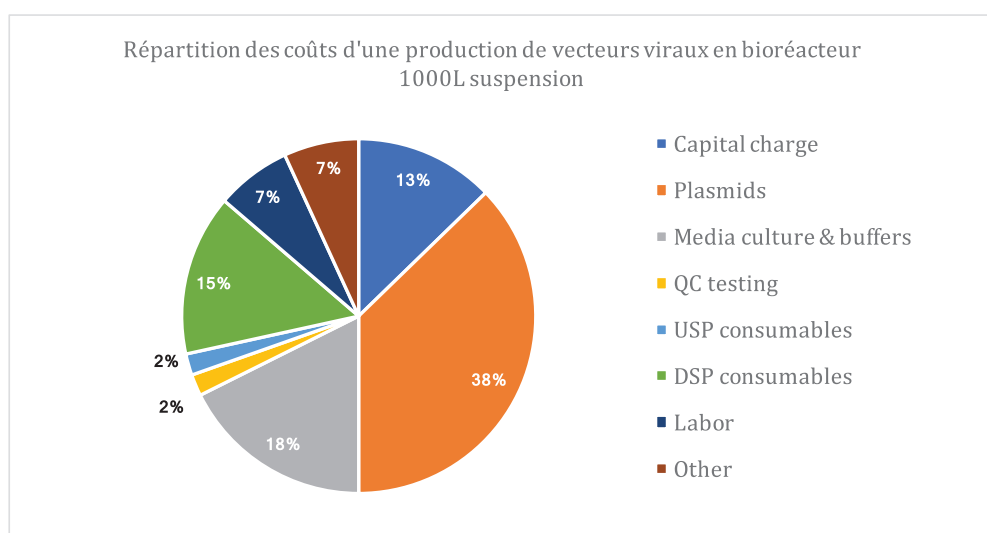


Figure 47 : Répartition des coûts de production pour un procédé suspension à l'échelle 1000L <sup>(182)</sup>

### 3.1. Augmenter l'échelle : vers un procédé en suspension

La technique d'amplification cellulaire adhérente a été la première mise au point. Bien qu'elle permette d'obtenir de bons rendements en vecteurs, elle soulève deux problèmes majeurs :

- **L'ajout de Sérum de Veau Fœtal (SVF) dans le milieu de culture.** De par le risque de transmission d'agents infectieux, les réactifs d'origine animale tels que le SVF doivent être extrêmement contrôlés et leur source caractérisée. Par souci de sécurité, les recommandations actuelles incitent les industriels à diminuer voire éviter l'utilisation de réactifs d'origine animale <sup>(133)</sup>.
- **La difficulté d'augmentation d'échelle :** l'augmentation d'échelle d'un procédé adhérent requiert la multiplication du nombre de flasques de culture afin d'augmenter la surface d'adhésion des cellules et permettre leur expansion en nombre suffisant ; c'est le principe de scale-out, qui consiste à augmenter les performances en ajoutant plus d'équipements. Bien que techniquement réalisable, cette solution ne constitue pas une option viable pour la production de vecteurs viraux à l'échelle industrielle, en termes de main-d'œuvre/manipulations, de coût et d'espace <sup>(131)</sup>. Pour illustrer cette problématique, l'amplification cellulaire permettant d'obtenir une quantité supérieure à  $1.10^{16}$  VG (quantité potentiellement requise pour un essai clinique de phase III) nécessiterait plus de 500 Hyperstacks™ (flacons de culture à 36 étages) <sup>(129)</sup>.

Des efforts ont été déployés pour permettre l'augmentation d'échelle en procédé adhérent, avec la mise au point de « bioréacteurs adhérents » moins encombrants que les flasques de culture. Un exemple illustrant ce principe est le bioréacteur à usage unique iCELLis® 500 de Pall, qui offre une surface de culture allant jusqu'à 500m<sup>2</sup>, ce qui correspond à 278 Hyperstacks 36 <sup>(190)</sup> (Figure 48).



Figure 48 : à gauche, un Hyperstack à 36 étages ; à droite, le bioréacteur iCELLis® <sup>(191)</sup>

Toutefois, une augmentation d'échelle en « scale-up », qui consiste à augmenter le volume de culture, est beaucoup plus efficace qu'en « scale-out », qui constitue à démultiplier le nombre de flacons de culture (Figure 49). Le scale-up ne pourra se faire que via un procédé suspension, qui permet de faire pousser en bioréacteur une quantité de cellules bien plus importante avec des paramètres de culture régulés et contrôlés.

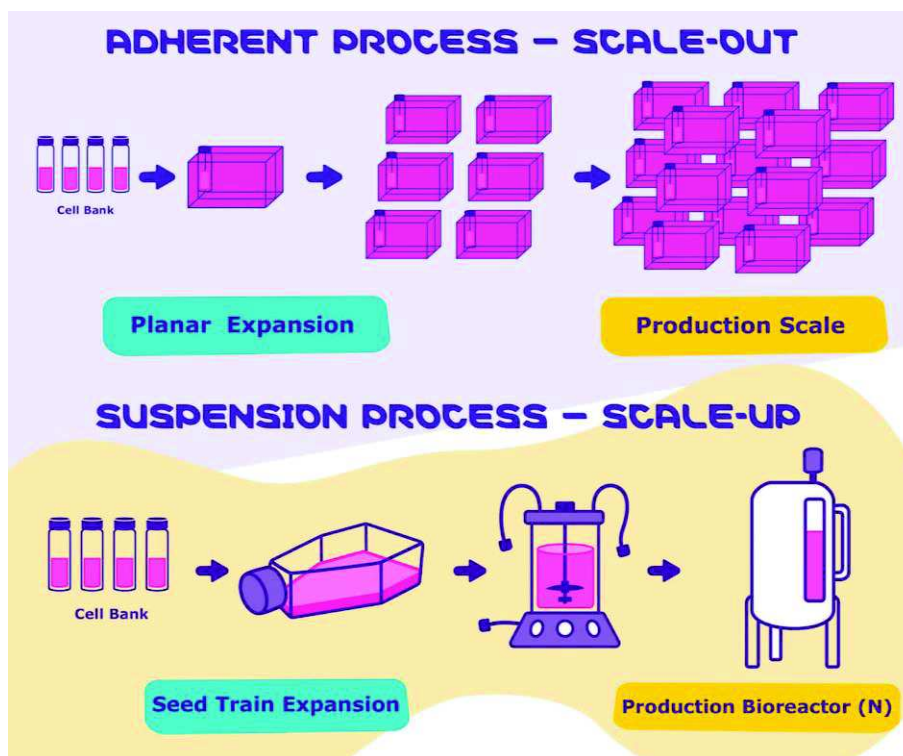


Figure 49 : Comparaison des procédés adhérent et suspension (scale-out VS scale-up) <sup>(192)</sup>

Par rapport au procédé adhérent, le procédé en suspension en bioréacteur présente les avantages suivants <sup>(192)</sup> :

- Plus économe en termes de main-d'œuvre et de ressources
- Possibilité de produire de plus gros lots, ce qui permet de réduire les coûts de contrôle qualité
- Meilleurs contrôle et robustesse grâce à l'automatisation du bioréacteur
- Moins risqué en termes de risque de contamination du produit et des opérateurs (absence de phase ouverte)

### 3.2. Standardiser les étapes : vers une plateforme de production

Le manque de standardisation des procédés de production des vecteurs viraux génère des coûts considérables, qui sont en partie responsables (mais pas seulement) des prix parfois astronomiques annoncés pour certains médicaments de thérapie génique. Le Zolgensma®, mis sur le marché en 2019 pour le traitement de l'amyotrophie spinale, avait battu le record

mondial avec son prix affiché à 2,125 millions de dollars l'injection unique <sup>(193)</sup>. Ce système n'étant pas viable, il semble indispensable pour les industriels de s'orienter vers des systèmes standardisés de plateformes de production afin de faciliter l'accès de ces médicaments au plus grand nombre de patients.

### 3.2.1. Standardisation des étapes upstream

#### 3.2.1.1. Solutionner la problématique des plasmides

Les plasmides, avec les cellules, constituent les matières de départ les plus critiques du procédé de production des vecteurs viraux. Pour un procédé en suspension de 1000L, ils représentent plus d'un tiers des dépenses ([Figure 47](#)). La qualité des plasmides utilisés varie en fonction de l'étape de développement du médicament de thérapie génique. En développement fondamental et préclinique, des plasmides de grade « R&D » sont utilisés ; leur production est facile et peu coûteuse, de nombreux laboratoires sont capables de les produire. Cependant lors du passage à la phase clinique où le médicament expérimental sera administré à l'homme, des plasmides de « grade GMP » doivent être utilisés <sup>(125)</sup>. Le nombre d'essais cliniques de thérapie génique ne cessant d'augmenter, la demande en plasmides de « grade GMP » augmente également, nécessitant la production de plasmides à plus large échelle et du niveau de qualité requis <sup>(148)</sup>. Pour chaque médicament de thérapie génique sur le marché (donc en phase commerciale), une quantité estimée de 100 à 1000 grammes de plasmides par an sera nécessaire, et ce pour chaque plasmide entrant dans les matériels de départ <sup>(148)</sup> (soit 3 plasmides différents dans le cas d'une tri-transfection).

Actuellement, la production des plasmides est systématiquement sous-traitée à un fabricant spécialisé <sup>(148)</sup>. Si de nombreux laboratoires sont capables de produire des plasmides de grade « R&D », au contraire un nombre très restreint de fabricants peut produire des plasmides selon le niveau de qualité requis pour une utilisation en clinique. Ainsi, selon la loi de l'offre et de la demande, le coût des plasmides de grade GMP et leur délai de production par les fabricants constituent un point bloquant et stratégique dans la production de vecteurs viraux. A titre d'exemple, 1 gramme de plasmide de grade GMP coûte environ 300 000€, et le délai d'approvisionnement est d'environ 9 mois. Pour le scale-up de 500 à 2000L (échelle commerciale), il faudrait plusieurs grammes de plasmides pour un seul lot de vecteurs <sup>(194)</sup>.

Certains fabricants proposent également un grade intermédiaire de plasmides, un peu moins coûteux que les plasmides de grade GMP et de meilleure qualité que les plasmides R&D : ce sont les plasmides « GMP source ». Contrairement aux plasmides de grade R&D, la production de plasmides de grade GMP est encadrée par un processus global d'assurance qualité, et la documentation fournie au client est beaucoup plus complète. Les différences entre les grades de plasmides sont illustrées en [Figure 50](#).

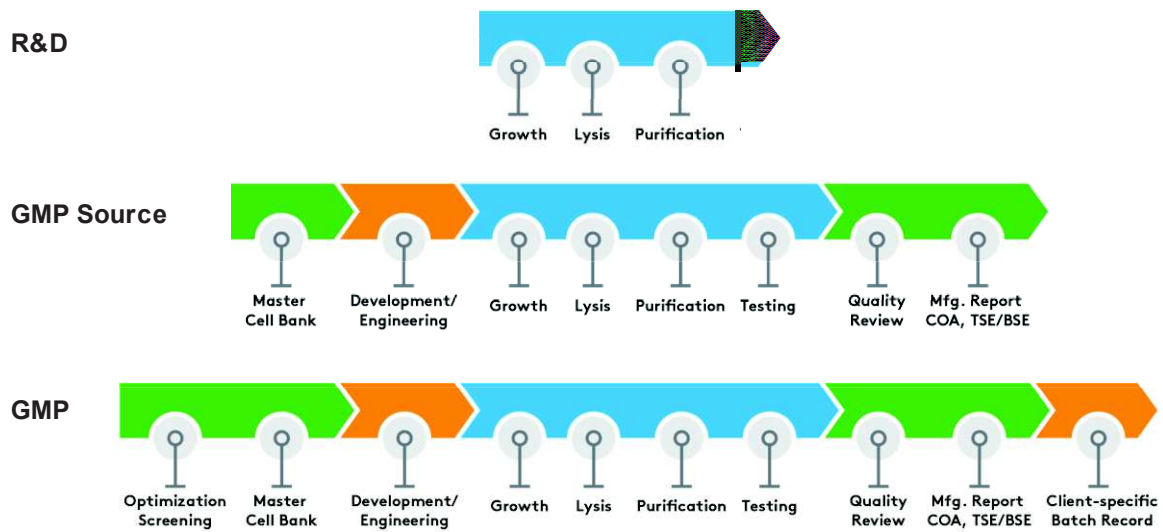


Figure 50 : Les différents grades de plasmides <sup>(195)</sup>

La production de plasmides à large échelle et d'un niveau de qualité suffisant pour leur utilisation en clinique reste un enjeu majeur. Afin de réduire les coûts liés aux plasmides, certaines sociétés développent des procédés de production de plasmides sans cellules (pour rappel, les plasmides sont produits par des cellules bactériennes recombinantes) <sup>(196)</sup>. Ceci permettrait de diminuer le nombre d'étapes de production, et ainsi d'économiser du temps et de l'argent. Une autre solution potentielle est de s'affranchir des plasmides en produisant les vecteurs non pas grâce à la tri-transfection, mais en utilisant des lignées cellulaires productrices ou d'emballage.

### 3.2.1.2. Utiliser des lignées cellulaires productrices / d'emballage

Le système de tri-transfection transitoire permet une grande flexibilité et une rapidité de production, intéressantes et stratégiques pour les phases précoces du développement de médicaments de thérapie génique. Le développement de lignées cellulaires productrices ou d'emballage, exprimant les gènes nécessaires à la production des vecteurs viraux recombinants est plus long et complexe, mais semble être une solution plus rentable et plus robuste pour le passage à l'échelle industrielle <sup>(156)</sup>. Avoir une telle lignée à disposition permet d'obtenir un titre constant en rAAV et d'éviter l'étape contraignante d'approvisionnement en plasmides, indispensable avec la méthode de transfection transitoire. Les lignées cellulaires productrices permettent d'obtenir un procédé de production des rAAV plus robuste et reproductible, avec un délai de production plus court. Par exemple, l'entreprise Cevec avec sa plateforme Elevecta®, propose de développer une lignée cellulaire productrice stable « sur-mesure », contenant les gènes Rep/Cap, helper ainsi que le gène d'intérêt <sup>(197)</sup> (Figure 51).



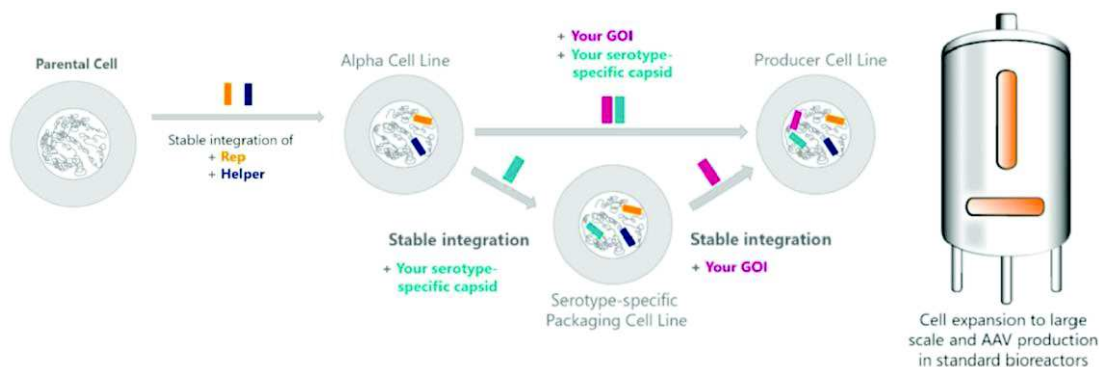


Figure 51 : Principe de fonctionnement de la plateforme Elevecta® (197)

Avec ce système, pas besoin de virus helper, d'agent de transfection coûteux ni de plasmides de grade GMP. Il présente également l'avantage d'être flexible : il est possible d'utiliser uniquement l'« alpha cell line » (comprenant les gènes Rep et Helper), par exemple au stade de R&D et développement préclinique, puis de passer à la packaging cell line (comprenant les gènes Rep, Helper et Cap) pour les premières phases du développement clinique. Il faut alors transfecter cette lignée avec le gène d'intérêt. Enfin, à plus grande échelle pour une production industrielle, il est possible de générer la lignée cellulaire productrice en intégrant le gène thérapeutique. La même « plateforme » peut donc être utilisée tout au long du développement du médicament.

Cependant, l'économie des dépenses liées aux plasmides et aux agents de transfection est à mettre en regard du coût de développement des différentes lignées cellulaires. Les avantages et inconvénients des différentes stratégies de production de vecteurs viraux sont regroupés dans le Tableau 13 ci-dessous.

Stratégie de production	Avantages	Inconvénients
<b>TRANSFECTION + INFECTION</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise à l'échelle</li> <li>- Croissance des cellules dans un milieu sans sérum</li> <li>- Production de vecteurs efficace en suspension</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contamination par un virus helper</li> <li>- Délai de production des stocks de virus helper / mise au point de banques virales</li> <li>- Peut nécessiter un milieu de culture avec sérum</li> </ul>
<b>TRANSFECTION SEULE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de contamination par un virus helper</li> <li>- Production rapide de virus à petite échelle</li> <li>- Protocole de transfection simple</li> <li>- Grande flexibilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peut nécessiter un milieu de culture avec sérum</li> <li>- Production d'une importante proportion de capsides vides</li> <li>- Difficulté d'approvisionnement et coût des plasmides pour une production à grande échelle</li> </ul>
<b>LIGNEES CELLULAIRES PRODUCTRICES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Titre en rAAV élevé et reproductible</li> <li>- Délais de production raccourcis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Délai de mise au point et caractérisation des lignées cellulaires</li> </ul>

Tableau 13 : Avantages et inconvénients des différentes stratégies de production des rAAV

### 3.2.2. Standardisation des étapes downstream

Les approches de purification actuelles sont basées sur des procédés de laboratoires peu industrialisables et peu adaptés pour une production à l'échelle clinique et commerciale. Un des enjeux cruciaux de la partie downstream du procédé est le rendement en vecteur. En effet, plus le nombre d'étapes de purification augmente, plus le rendement en produit diminue (Figure 52), et ce même pour des étapes à haut rendement <sup>(157)</sup>. Ceci souligne l'importance du développement de plateformes industrielles permettant une purification efficace des vecteurs viraux.

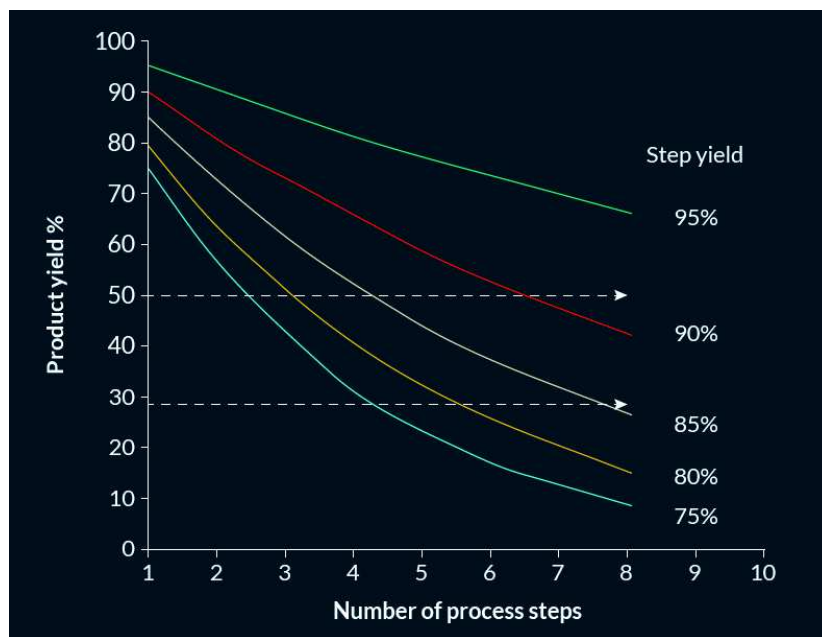


Figure 52 : Evolution du rendement en fonction du nombre d'étapes <sup>(157)</sup>

Un des principaux leviers pour diminuer le nombre d'étapes et éviter une baisse de rendement importante est l'optimisation de l'étape de chromatographie. Le développement de résines de haute affinité pour les vecteurs viraux, décrites dans la partie III.A.5.3.1., constitue déjà une avancée majeure dans la diminution du nombre d'étapes de purification <sup>(159)</sup> (Figure 53). Une unique étape de chromatographie en remplaçant plusieurs, le rendement en produit est plus élevé.

Dans un but de standardisation de la méthode de chromatographie d'affinité, des résines permettant la purification de plusieurs sérotypes ont été développées. C'est le cas par exemple de la résine AVB Sepharose™ commercialisée par Cytiva (qui permet de purifier les sérotypes 1, 2, 3 et 5 a minima <sup>(198)</sup>), ou de la résine POROS AAVX de ThermoFisher (qui permet de purifier les sérotypes AAV1 à 8 <sup>(160)</sup>). Des colonnes de chromatographie prépackées, contenant déjà la résine d'affinité, sont également disponibles.

Ces résines d'affinité permettent ainsi la purification de différents sérotypes de vecteurs avec une haute spécificité et une haute capacité et ce en une seule étape, ce qui améliore la durée et le rendement de la phase downstream. Cependant, le prix de ces résines reste dissuasif : une bouteille de 50 mL de résine POROS™ AAVX coûte 5800€<sup>(199)</sup>. Pour un procédé suspension à échelle 400L, un volume supérieur à 1L de résine Poros AAVX peut être nécessaire, pour un coût avoisinant les 60 000€. Alors que la plupart des étapes de production sont réalisées avec des technologies à usage unique, le coût associé aux résines d'affinité (qui représente parfois la moitié des dépenses en matières premières de la partie downstream<sup>(160)</sup>), impose la réutilisation de la colonne de chromatographie packée pour plusieurs lots d'un même produit.

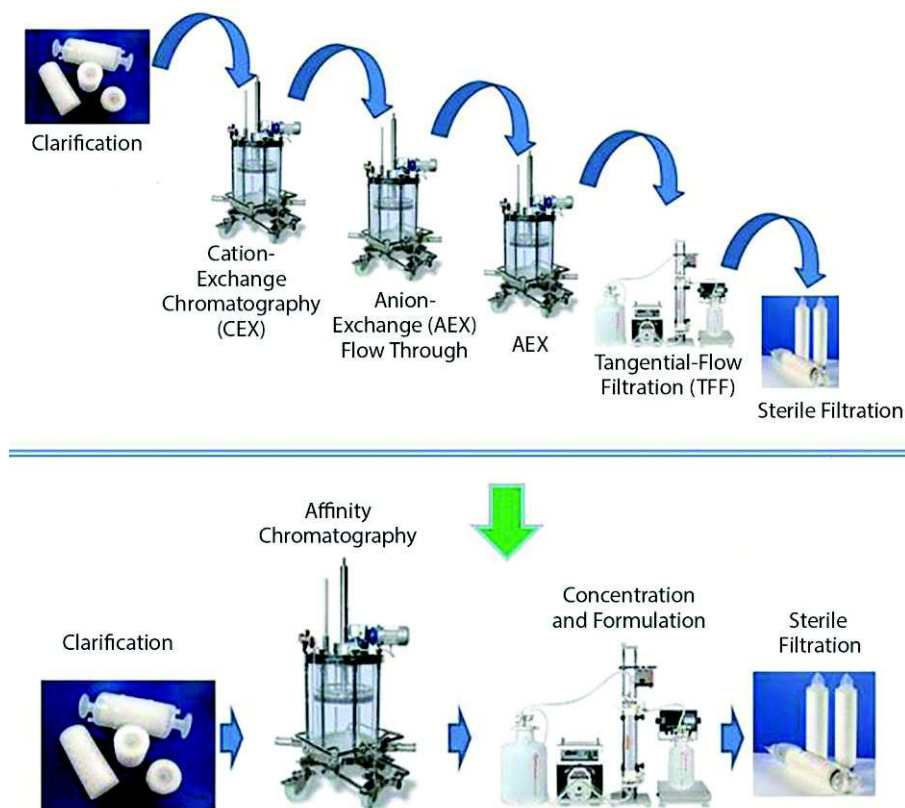


Figure 53 : Simplification du processus de purification des rAAV grâce au développement de résines d'affinité performantes<sup>(161)</sup>

Une autre limite de l'étape de chromatographie d'affinité est sa durée. En effet, le temps de chargement de la récolte de vecteurs sur la résine est très long, et ce pour deux raisons : les titres en vecteurs étant relativement peu élevés, les vecteurs se trouvent « dilués » dans le volume qui est chargé sur la résine. De plus, l'attachement des particules virales aux ligands de la résine nécessite le passage des vecteurs à travers les pores de la résine, ce qui demande des temps de résidence élevés<sup>(194)</sup>. Afin d'éviter cet inconvénient, les colonnes de chromatographie sont parfois surdimensionnées pour diminuer la durée de la phase de chargement. La

technologie Fibro peut constituer une réponse potentielle à cette durée importante de l'étape de chromatographie d'affinité. Les pores de la phase stationnaire (fibres de cellulose), sur lesquels sont fixés les ligands, sont suffisamment larges et évitent de devoir attendre que les vecteurs diffusent dans les pores (Figure 54). Le temps de résidence est diminué d'un facteur 40 par rapport aux résines d'affinité « classiques »<sup>(200)</sup>, permettant d'augmenter la productivité de cette étape. Cette technologie, déjà utilisée pour la purification d'anticorps monoclonaux, n'existe à l'heure actuelle que pour des échelles de production R&D.

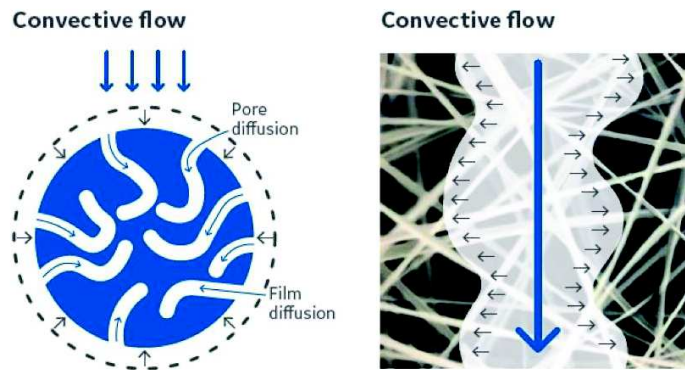


Figure 54 : Flux de diffusion à travers une résine poreuse (à gauche) et une matrice Fibro (à droite)<sup>(200)</sup>

### 3.3. Accélérer l'augmentation des capacités de production

A côté de l'optimisation du procédé de production de vecteurs viraux en lui-même, l'augmentation des capacités de production passe aussi par la mise en place de zones de production répondant aux besoins des industriels. Il existe des solutions de production flexibles et plus rapides que la construction de salles blanches conventionnelles. Le système KUBio™ de Cytiva, lancé fin 2019, consiste à livrer des salles de production modulaires pour réduire les délais de développement<sup>(201)</sup>. Ce sont des modules préfabriqués, d'environnement confiné C3 (groupe d'OGM dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est modéré, équivalent au BioSafety Level 2) flexibles et adaptables, conformes pour une production GMP (Figure 55).



Figure 55 : Un module KUBio™<sup>(201)</sup>

Ces modules peuvent être intégrés dans un bâtiment existant ; une fois le module en place, les systèmes de production choisis (à usage unique) sont installés selon le principe de FlexFactory. Il permet d'enchaîner les différentes étapes du procédé de production (Figure 56).

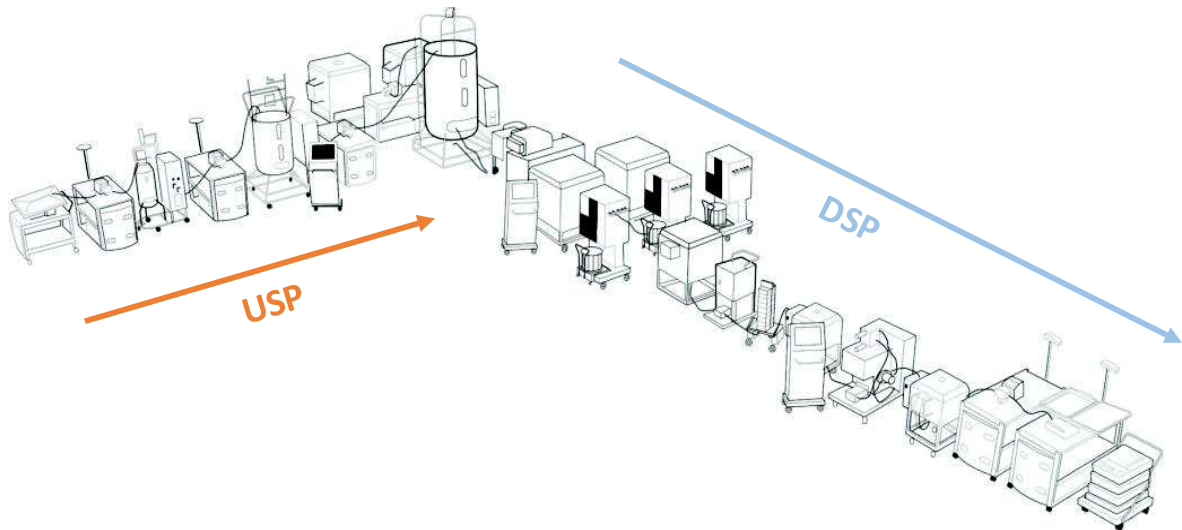


Figure 56 : Systèmes de production proposés dans le service de Flex Factory Cytiva (201)

Pour augmenter les capacités de production il est possible de rajouter des modules (Figure 57), qui peuvent être installés sur le site industriel en environ un an, offrant un gain de temps considérable par rapport à une construction en dur d'une zone de production. Ce système vient se positionner dans la stratégie de production « buy VS build » : sous-traiter la production à une CDMO ou investir pour fabriquer soi-même.



Image courtesy of Germfree

Figure 57 : Plusieurs modules KUBio™ (201)

## Conclusion

Le concept de médicament de thérapie génique, apparu dans les années 1950 et mis en œuvre pour la première fois dans les années 1990, connaît un essor considérable depuis la mise sur le marché du premier médicament de thérapie génique en 2012. La technique principalement utilisée consiste à corriger un gène défectueux en apportant au patient une copie saine de ce gène. Les médicaments de thérapie génique, qui font partie des « médicaments de thérapies innovantes », apportent ainsi une solution thérapeutique à certaines maladies génétiques, qui étaient jusqu'alors incurables. Dès lors, le nombre d'essais cliniques mettant en jeu des vecteurs viraux a connu une augmentation notable. Or 80% des candidats médicaments sont développés par des start-up ou des laboratoires académiques qui ne disposent pas des ressources nécessaires pour produire des lots GMP, de la qualité requise pour l'administration des médicaments à l'Homme. De ce fait, les industriels doivent faire face à une augmentation considérable de la demande de production. En effet, le passage au stade clinique requiert la production d'une quantité de vecteurs bien supérieure à celle nécessaire aux phases de recherche et préclinique.

La structure biologique complexe des vecteurs viraux explique en partie la complexité de leur procédé de production. Bien que les méthodes de production tendent à s'industrialiser de plus en plus, certaines étapes restent manuelles, difficilement standardisables, et les technologies actuelles ne permettent pas l'augmentation d'échelle nécessaire pour répondre à la demande. Peuvent être cités parmi les défis à surmonter :

- L'approvisionnement en matériels de départ complexes et coûteux que sont les banques de cellules et les plasmides ;
- L'augmentation d'échelle des phases d'amplification cellulaires, plus aisée avec les procédés en suspension qu'avec les procédés adhérents ;
- La nécessité d'augmenter la productivité des cellules lors des phases upstream ;
- La difficulté de standardisation des étapes de purification ;
- Le coût global de la production, qui influence le prix de commercialisation des médicaments de thérapie génique et soulève la problématique de l'inégal accès à ces traitements innovants.

Ainsi, le développement de systèmes de production et de purification capables de générer des quantités suffisantes de vecteurs constitue un réel défi. Seule la mise en place d'une rupture technologique permettra de répondre à la demande croissante et de maîtriser les coûts de production, facilitant ainsi l'accessibilité aux médicaments de thérapie génique.

## Annexes

### **Annexe III.2 : Description des confinements pour l'utilisation d'OGM en milieu industriel**

Les installations mettant en œuvre des OGM dans un processus de production industrielle sont soumises à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), sous la rubrique 2680 de la nomenclature.

Cette réglementation soumet les établissements soit à déclaration pour ceux utilisant des organismes de classe 1 de risque, soit à autorisation lorsque des organismes des classes de risque 2, 3 et 4 sont employés ou manipulés.

Outre des prescriptions générales de protection de l'environnement concernant le bruit, les odeurs et le traitement des déchets, les conditions de confinement exigées sont données par les arrêtés du 2 juin 1998.

L'instruction des dossiers de demande d'agrément et de déclaration ou de demande d'autorisation est réalisée sous l'autorité du préfet du département d'implantation de l'installation.

#### **Dispositions spécifiques relatives au confinement des locaux où sont utilisés les organismes génétiquement modifiés du groupe I**

1. L'exploitant tient à la disposition de l'inspecteur des installations classées un dossier relatif aux organismes génétiquement modifiés utilisés. Ce dossier comprend pour chaque organisme génétiquement modifiés ou combinaison d'organismes génétiquement modifiés l'avis du HCB relatif au classement et aux conditions de confinement à mettre en œuvre, et une copie de l'arrêté d'agrément.

Pour les organismes génétiquement modifiés utilisés avant l'entrée en vigueur du présent arrêté, seul l'avis de classement de la Commission de Génie Génétique ou HCB est joint au dossier.

2. L'installation doit être conçue et aménagée de façon à maintenir au plus faible niveau possible l'exposition des lieux de travail et de l'environnement à tout agent physique, chimique ou biologique.

3. Pour la mise en œuvre de micro-organismes modifiés du groupe I, les principes de bonnes pratiques microbiologiques sont appliqués.

4. La zone de travail, le sol, les murs, les plafonds, les appareils, ustensiles et récipients utilisés dans l'installation doivent être maintenus en parfait état de propreté et régulièrement décontaminés.

Aucun matériel autre que ceux nécessaires au fonctionnement de l'installation ne doivent séjourner dans les zones de travail.

5. Les fermenteurs sont équipés de vannes, de presse-étoupe et de joints permettant d'assurer l'étanchéité. Ils sont munis d'un dispositif de prise d'échantillon stérilisable à la vapeur.

Les entraînements de gouttelettes de milieu de culture vers l'extérieur sont évités au moyen d'agents antimousse ou de systèmes dévésiculeurs.

6. La mise en culture de micro-organismes génétiquement modifiés doit être réalisée en système clos sauf si les dispositions relatives à l'agrément ne l'exigent pas.

7. L'exploitant doit être en mesure, si nécessaire, de vérifier la présence d'organismes génétiquement modifiés viables en dehors du confinement.

8. Les appareils de mesure et instruments impliqués dans le contrôle du confinement sont vérifiés et conservés en bon état.

Les postes de sécurité microbiologique doivent être contrôlés tous les ans. Les autoclaves doivent être contrôlés conformément à la réglementation des appareils à pression.

Les rapports de contrôle sont tenus à la disposition de l'inspecteur des installations classées.

9. Toutes dispositions sont prises pour lutter contre les vecteurs, par exemple les insectes et les rongeurs.

10. Une analyse des effluents aqueux permettant de rechercher la présence de micro-organismes génétiquement modifiés viables doit être faite aux frais de l'exploitant au minimum une fois par trimestre pendant les périodes d'utilisation du micro-organisme génétiquement modifié.

Les résultats de ces analyses sont conservés et présentés, à sa demande, à l'inspecteur des installations classées.

11. Sauf si l'exploitant dispose d'une autorisation de dissémination d'organismes génétiquement modifiés, les déchets, les emballages où subsistent des micro-organismes génétiquement modifiés et la biomasse des fermenteurs doivent être inactivés par des moyens validés avant élimination.

12. L'exploitant doit toujours disposer d'un désinfectant d'efficacité reconnue en quantité suffisante pour intervenir en cas de fuite ou d'accident sur l'installation.

13. En cas de contamination d'un fermenteur ayant conduit à l'arrêt de la fermentation, le contenu doit être inactivé avant rejet.

14. En cas de bris de verre ou de fuite de cuve, les débris et produits sont inactivés au moyen d'un produit désinfectant approprié. Toute réparation des parties souillées de l'installation doit être faite selon des procédures appropriées destinées à éviter un risque de contamination de l'intervenant et de l'environnement par les micro-organismes génétiquement modifiés mis en œuvre.

15. Les dispositions des articles 3, 5, 6 et 10 ci-dessus ne sont pas applicables aux installations utilisant des organismes génétiquement modifiés du groupe I qui ne sont pas des micro-organismes. Dans le cas d'utilisation d'animaux génétiquement modifiés, l'installation est conçue, en fonction de la biologie de l'espèce, pour prévenir la fuite des animaux vers le milieu extérieur, y compris de leurs gamètes dans le cas des animaux aquatiques. Dans le cas d'utilisation de végétaux génétiquement modifiés, l'installation est conçue, en fonction de la biologie de l'espèce, pour prévenir la dissémination de ces végétaux, notamment par le pollen et les graines. Les prescriptions relatives à l'agrément précisent au cas par cas les dispositifs techniques à mettre en œuvre.

Les prescriptions relatives à l'utilisation confinée des organismes génétiquement modifiés qui ne sont pas des micro-organismes au sens de l'article 8 de l'arrêté du 2 juin 1998, notamment les installations d'élevage d'animaux transgéniques, sont établies au cas par cas, suivant la nature des espèces entretenues, après avis du HCB.



**Tableau – Conditions d'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés de classes 2, 3 et 4 dans des processus de production industrielle**

MESURES DE CONFINEMENT	NIVEAUX DE CONFINEMENT		
	2	3	4
1°) Signalisation du lieu de travail (pictogramme "danger biologique").	Oui	Oui	Oui
2°) Séparation du lieu de travail des autres activités dans le même bâtiment.	Déterminée au cas par cas	Oui	Oui
3°) Localisation des systèmes clos dans la zone contrôlée.	Déterminée au cas par cas	Oui	Oui
4°) Accès à la zone contrôlée via un sas.	Non	Oui, si mise en dépression	Oui
5°) Accès à la zone contrôlée réservé aux seuls travailleurs autorisés.	Oui	Oui	Oui
6°) Présence d'une fenêtre d'observation ou système équivalent permettant de voir les occupants.	Déterminée au cas par cas	Oui	Oui
7°) Résistance des surfaces à l'eau et nettoyage et désinfection aisés.	Oui (sol)	Oui (sol, mur, plafond)	Oui (sol, mur, plafond) et résistance aux agents chimiques de nettoyage
8°) Surfaces des paillasses résistantes aux acides, alcalis et solvants et désinfectants.	Oui	Oui	Oui
9°) Installations pour le lavage et la décontamination des mains munies de robinets à commande non manuelle.	Oui	Oui	Oui
10°) Installations sanitaires dans la zone contrôlée.	Déterminé au cas par cas	Non	Non
11°) Le personnel doit prendre une douche avant de quitter la zone contrôlée.	Non	Déterminé au cas par cas	Oui
12°) Vêtement de protection.	Oui	Oui	Oui, change complet
13°).Gants.	Déterminé au cas par cas	Oui	Oui
14°) Fenêtres.	Fermées	Hermétiquement closes	Hermétiquement closes et incassables
15°) Possibilité de rendre la zone contrôlée hermétique pour permettre la désinfection par méthode gazeuse.	Déterminée au cas par cas	Oui	Oui
16°) Ventilation adaptée de la zone contrôlée pour minimiser la contamination de l'air.	Déterminée au cas par cas	Déterminée au cas par cas	Oui
17°) Système de ventilation de secours.	Non	Non	Oui
18°) Maintien d'une pression négative dans la zone contrôlée par rapport aux zones voisines.	Non	Oui (1)	Oui
19°) Système d'alarme adapté pour détecter des changements inacceptables de la pression de l'air.	Non	Oui, si mise en dépression	Oui
20°) Filtration HEPA de l'air entrant et extrait de la zone contrôlée.	Non	Oui (air extrait)	Oui (air entrant et extrait)
21°) Lutte efficace contre les vecteurs, par exemple rongeurs et insectes.	Oui	Oui	Oui
22°) Présence d'un autoclave double entrée dans la zone contrôlée.	Non	Oui ou à proximité, sous réserve de la mise en place de procédures évaluées et conférant la même protection	Oui
23°) Manipulation des micro-organismes viables dans un système qui sépare physiquement le procédé de l'environnement.	Oui	Oui	Oui
24°) Prélèvement des échantillons, apport de substances au système clos et transfert de micro-organismes viables à un autre système clos effectués de façon à :	Minimiser la dissémination	Empêcher la dissémination	Empêcher la dissémination
25°) Conception des joints et garnitures des systèmes clos de façon à :	Minimiser la dissémination	Empêcher la dissémination	Empêcher la dissémination
26°) Sauf si le micro-organisme génétiquement modifié vivant est le produit, sortie du système clos des fluides de cultures après que les micro-organismes aient été :	Inactivés par des moyens validés	Inactivés par des moyens validés	Inactivés par des moyens validés
27°) Traitement des gaz rejetés du système clos de façon à :	Minimiser la dissémination	Empêcher la dissémination	Empêcher la dissémination
28°) Conception de la zone contrôlée de façon à retenir le déversement total du plus grand contenant.	Oui	Oui	Oui
29°) Installation d'un système de collecte et d'inactivation des effluents des éviers, douches et de lavage des sols avant rejet.	Non	Oui	Oui
30°) Inactivation du matériel contaminé et des déchets.	Oui	Oui	Oui
31°) Inactivation des effluents biologiques par des moyens validés avant rejet final.	Oui	Oui	Oui
32°) Moyens de communication avec l'extérieur.	Non	Déterminés au cas par cas	Oui

(1) ou moyen alternatif de confinement évalué procurant des conditions de sécurité biologique équivalentes.

## Références bibliographiques

1. Institut Imagine. Qu'est-ce qu'une maladie génétique ? [Internet] [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.institutimagine.org/fr/quest-ce-quune-maladie-genetique-143>
2. Agence biomédecine. Génétique médicale : ADN, hérédité, tests. [Internet] [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://genetique-medicale.fr/la-genetique-l-essentiel/genetique-et-maladies-quels-liens/article/qu-est-ce-qu-une-maladie-genetique>
3. Genopole. Histoire de la génétique [Internet] 2009 [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.genopole.fr/Histoire-de-la-genetique.html>
4. Gene Expression Scitable by nature education [Internet] [page consultée le 25 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669/>
5. Orpha school. Transmission des maladies génétiques [Internet]. [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.orpha.net/orphaschool/elearn1.htm>
6. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) [Internet] [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>
7. Science & Vie. Séquençage de l'ADN : il sauve désormais des vies [Internet] 2016 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.science-et-vie.com/corps-et-sante/sequencage-de-l-adn-il-sauve-desormais-des-vies-33258>
8. Check Hayden E. Technology: The \$1,000 genome. Nat News. 20 mars 2014;507(7492):294.
9. Institut Imagine. Qu'est-ce qu'un test génétique ? [Internet] [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.institutimagine.org/fr/quest-ce-quun-test-genetique-157>
10. Agence de la biomédecine. Diagnostic prénatal, diagnostic préimplantatoire et génétique postnatale [Internet] 2020 [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/Diagnostic-prenatal-diagnostic-preimplantatoire-et-genetique-postnatale>
11. Ministère des Solidarités et de la Santé. Programme national de dépistage néonatal [Internet] 2020 [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/DNN>
12. Inserm. Mucoviscidose [Internet] 2014 [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/mucoviscidose>
13. LEEM. Journée internationale des maladies rares - 29 février 2020 [Internet] 2020 [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.leem.org/journee-internationale-des-maladies-rares-29-fevrier-2020>
14. Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. Annu Rev Med. 2019;70(1):273-88.
15. Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. Nature. 10 août 2018;560(7718):291-2.
16. Haute Autorité de Santé. Onpattro [Internet] 2019 [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2912140/fr/onpattro](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2912140/fr/onpattro)
17. Onpattro®. How Onpattro® (patisiran) works [Internet] [page consultée le 25 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.onpattrohcp.com/how-onpattro-works>
18. Orphanet. Hémophilie B [Internet] 2009 [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=FR&Expert=98879](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=98879)
19. Derouineau P, Christophe O, Piétu G. Nouveaux médicaments pour le traitement des maladies hémorragiques rares. Association Française de Hémophiles. Brochure avril 2020.
20. ClinicalTrials.gov [Internet] [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/>
21. Intrado Globe Newswire. UniQure announces one-year follow-up data from the phase IIb study of etranacogene dezaparvovec and long-term follow-up data for AMT-060 in patients with hemophilia

- B [Internet] 2020 [page consultée le 18 avr 2020]. Disponible sur: <https://tools.eurolandir.com/tools/Pressreleases/GetPressRelease/?ID=3677182&lang=en-GB&companycode=nl-quire&v=>
22. UniQure. Hemophilia [Internet] [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <http://uniquire.com/gene-therapy/hemophilia.php>
  23. LEEM. Thérapie génique : les traitements du futur ? [Internet] [page consultée le 25 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.leem.org/100-questions/therapie-genique-les-traitements-du-futur>
  24. Haute Autorité de Santé. Luxturna [Internet] 2019 [page consultée le 19 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2964759/fr/luxturna](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2964759/fr/luxturna)
  25. Fischer A. Cours Thérapie Génique (1) Collège de France [Internet] 2015 [page consultée le 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.college-de-france.fr/site/alain-fischer/course-2015-06-02-17h00.htm>
  26. Lannoy N, Nathalie Lannoy, Cédric Hermans. Thérapie génique en 2017: Etat des lieux et perspectives *Louvain Med.* 2017 ; 136 (1): 1-8. *Louvain Méd.* 30 janv 2017;136:1-8.
  27. EMA. Kymriah European public assessment report [Internet] 2018 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview_en.pdf)
  28. EMA. Yescarta European public assessment report [Internet] 2018 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview_en.pdf)
  29. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet.* févr 1995;9(2):184-90.
  30. Nowakowski A, Andrzejewska A, Janowski M, Walczak P, Lukomska B. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 18 avr 2013;73:1-18.
  31. Iowa Climate Science Education. Coronavirus 101 [Internet] 2020 [page consultée le 25 oct 2020]. Disponible sur: <https://iowaclimate.org/2020/02/11/coronavirus-101/>
  32. EMA. Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis [Internet] 2013 [page consultée le 20 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-management-clinical-risks-deriving-insertional-mutagenesis\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-management-clinical-risks-deriving-insertional-mutagenesis_en.pdf)
  33. Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol.* juill 2007;36(3):184-204.
  34. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 17 oct 2003;302(5644):415-9.
  35. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol.* oct 1998;72(10):8150-7.
  36. Encyclopedia Britannica. Retrovirus [Internet] [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.britannica.com/science/retrovirus>
  37. Appaiahgari MB, Vrati S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert Opin Biol Ther.* mars 2015;15(3):337-51.
  38. Amalfitano A, Parks RJ. Separating fact from fiction: assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy. *Curr Gene Ther.* mai 2002;2(2):111-33.
  39. Burney TJ, Davies JC. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet.* 29 mai 2012;5:29-36.
  40. Lee D, Liu J, Junn HJ, Lee E-J, Jeong K-S, Seol D-W. No more helper adenovirus: production of gutless adenovirus (GLAd) free of adenovirus and replication-competent adenovirus (RCA) contaminants. *Exp Mol Med.* oct 2019;51(10):1-18.
  41. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* oct 2008;21(4):583-93.

42. GeneMedi. AAV vector system, AAV production, transduction and AAV gene therapy | [Internet] [page consultée le 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.genemedi.net/i/aav-packaging>
43. Rossi A, Salvetti A. Intégration des vecteurs AAV et mutagenèse insertionnelle. *médecine/sciences*. févr 2016;32(2):167-74.
44. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. sept 2006;14(3):316-27.
45. Hauck B, Chen L, Xiao W. Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. mars 2003;7(3):419-25.
46. Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*. juill 2014;15(7):445-51.
47. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 1 déc 2017;8:87-104.
48. Floch V, Abgrall J-F, Férec C. Lipides cationiques, vecteurs non viraux pour le transfert de gènes : application potentielle aux cellules d'origine hématopoïétique. *Hématologie*. 27 janv 1998;4(1):57-66.
49. Parker A, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan P. Nonviral Gene Delivery: Techniques and Implications for Molecular Medicine. *Expert Rev Mol Med*. 1 oct 2003;5:1-15.
50. Chen W, Li H, Liu Z, Yuan W. Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 5 avr 2016. 8:68
51. Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, Sahoo P, Chauhan M. Polyplex: A Promising Gene Delivery System. 27 janv 2020;12:4681-6.
52. Sun Y, Yang Z, Wang C, Yang T, Cai C, Zhao X, et al. Exploring the role of peptides in polymer-based gene delivery. *Acta Biomater*. 15 sept 2017;60:23-37.
53. Bofinger R, Zaw-Thin M, Mitchell NJ, Patrick PS, Stowe C, Gomez-Ramirez A, et al. Development of lipopolyplexes for gene delivery: A comparison of the effects of differing modes of targeting peptide display on the structure and transfection activities of lipopolyplexes. *J Pept Sci*. 2018;24:e3131
54. Chaplot SP, Rupenthal ID. Dendrimers for gene delivery – a potential approach for ocular therapy? *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(4):542-56.
55. Santos A, Veiga F, Figueiras A. Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications. *Mater Basel Switz*. 21 déc 2019;13(1).
56. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. nov 1980;22(2 Pt 2):479-88.
57. Biewenga JE, Destrée OH, Schrama LH. Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique. *J Neurosci Methods*. janv 1997;71(1):67-75.
58. Bio-Rad. Biolistic delivery systems [Internet] [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5443.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf)
59. Kim Y-C. Skin Vaccination Methods: Gene Gun, Jet Injector, Tattoo Vaccine, and Microneedle. *Percutaneous Penetration Enhanc Phys Methods Penetration Enhanc*. 2017;485-99.
60. Lin MTS, Pulkkinen L, Uitto J, Yoon K. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol*. 2000;39(3):161-70.
61. Wells DJ. Gene Therapy Progress and Prospects: Electroporation and other physical methods. *Gene Ther*. sept 2004;11(18):1363-9.
62. Bioelectrochemical Society. Electroporation [Internet] [page consultée le 26 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.bioelectrochemical-soc.org/general/electroporation.php>
63. Young JL, Dean DA. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet*. 2015;89:49-88.
64. Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 mai 1992;89(10):4275-9.
65. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. août 2011;188(4):773-82.

66. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 6 mars 2014;370(10):901-10.
67. Dupret B, Angrand P-O. Targeted genome modifications using TALEN. *Med Sci MS*. Févr 2014;30(2):186-93.
68. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. janv 2013;14(1):49-55.
69. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. oct 2010;186(2):757-61.
70. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 25 2017;9(374).
71. Collectis. Manufacturing [Internet] [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.collectis.com/en/products/manufacturing>
72. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 17 août 2012;337(6096):816-21.
73. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li X-J. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 4 août 2015;10(1):35.
74. Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature*. 4 juin 2015;522(7554):20-4.
75. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *médecine/sciences*. déc 2014;30(12):1066-9.
76. Lu Y, Xue J, Deng T, Zhou X, Yu K, Huang M, et al. A phase I trial of PD-1 deficient engineered T cells with CRISPR/Cas9 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 20 mai 2018;36(15\_suppl):3050-3050.
77. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. juill 2013;31(7):397-405.
78. Querques I, Mades A, Zuliani C, Miskey C, Alb M, Grueso E, et al. A highly soluble Sleeping Beauty transposase improves control of gene insertion. *Nat Biotechnol*. 2019;37(12):1502-12.
79. Aronovich EL, McIvor RS, Hackett PB. The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum Mol Genet*. 15 avr 2011;20(R1):R14-20.
80. Genetic Education. Sleeping Beauty Transposon System: The Future of Gene Therapy [Internet] 2019 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://geneticeducation.co.in/the-sleeping-beauty-transposon-system/>
81. Chicaybam L, Abdo L, Carneiro M, Peixoto B, Viegas M, de Sousa P, et al. CAR T Cells Generated Using Sleeping Beauty Transposon Vectors and Expanded with an EBV-Transformed Lymphoblastoid Cell Line Display Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. *Hum Gene Ther*. 2019;30(4):511-22.
82. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 20 oct 1995;270(5235):475-80.
83. Antoine C, Müller S, Cant A, Cavazzana-Calvo M, Veys P, Vossen J, et al. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet Lond Engl*. 15 févr 2003;361(9357):553-60.
84. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 28 avr 2000;288(5466):669-72.
85. Destination Santé. Vers la fin des Bébés-bulles ? [Internet] 2014 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://destinationsante.com/vers-la-fin-des-bebes-bulles.html>
86. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 22 juill 2010;363(4):355-64.
87. Zhang W, Muck-Hausl M, Wang J, Sun C, Gebbing M, et al. Integration Profile and Safety of an Adenovirus Hybrid-Vector Utilizing Hyperactive Sleeping Beauty Transposase for Somatic Integration.

Plos one 2013;15(2): e0228902

88. Wang F, Qin Z, Lu H, He S, Luo J, Jin C, et al. Clinical translation of gene medicine. *J Gene Med.* 2019;21(7):e3108.
89. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med.* 2018;20(5):e3015.
90. The Journal of Gene Medicine. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Internet] 2021 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>
91. Haute Autorité de Santé. Glybera (alipogène tiparvovec) [Internet] 2016 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2579395/fr/glybera-alipogene-tiparvovec-therapie-genique](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2579395/fr/glybera-alipogene-tiparvovec-therapie-genique)
92. ICI.Radio-Canada. Deuxième vie pour le médicament à 1 million de dollars [Internet] 2019 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: <https://ici.radio-canada.ca/nouvelle/1351038/saguenay-maladie-genique-glybera-cnrc-ubc>
93. EMA. Imlygic European public assessment report [Internet] [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imlygic-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imlygic-epar-product-information_fr.pdf)
94. EMA. Strimvelis European public assessment report [Internet] 2016 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/strimvelis-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/strimvelis-epar-summary-public_en.pdf)
95. EMA. Luxturna European public assessment report [Internet] 2018 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview_en.pdf)
96. EMA. Zolgensma European public assessment report [Internet] 2020 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zolgensma-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zolgensma-epar-medicine-overview_en.pdf)
97. AFM-Téléthon. SMA : des nouvelles positives du Zolgensma [Internet] 2020 [page consultée le 24 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.afm-telethon.fr/actualites/sma-nouvelles-positives-zolgensma-140311>
98. EMA. Zynteglo European public assessment report [Internet] 2019 [page consultée le 27 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zynteglo-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zynteglo-epar-medicine-overview_en.pdf)
99. Biotech.info. Le KTE-X19 (Tecartus®), médicament de KITE, a reçu une autorisation de mise sur le marché conditionnelle en Europe pour le traitement du lymphome à cellules du manteau réfractaire ou en rechute [Internet]. 2020 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://biotechinfo.fr/article/le-kte-x19-tecartus-medicament-de-kite-a-recu-une-autorisation-de-mise-sur-le-marche-conditionnelle-en-europe-pour-le-traitement-du-lymphome-a-cellules-du-manteau-refractaire-ou-en-rechute/>
100. Biotech.info. La Commission Européenne autorise la mise sur le marché de Libmeldy™ d'Orchard Therapeutics, pour traiter la leucodystrophie métachromatique d'apparition précoce (LDM) [Internet] 2021 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://biotechinfo.fr/article/la-commission-europeenne-autorise-la-mise-sur-le-marche-de-libmeldy-dorchard-therapeutics-pour-traiter-la-leucodystrophie-metachromatique-d-apparition-precoce-ldm/>
101. Pharmaceutical technology. Gene therapy manufacturing 2019: investors concerned about lag time [Internet] 2019 [page consultée le 10 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/gene-therapy-manufacturing-2019/>
102. Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. 311, 32001L0083 nov 28, 2001. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/83/oj/fra>
103. Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. 159, 32003L0063 juin 27, 2003. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/63/oj/fra>

104. Règlement (CEE) n° 2309/93 du Conseil, du 22 juillet 1993, établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une agence européenne pour l'évaluation des médicaments [Internet]. OJ L, 31993R2309 août 24, 1993. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/1993/2309/oj/fra>
105. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. OJ L, 32007R1394 déc 10, 2007. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/fra>
106. Directive 2009/120/CE de la Commission du 14 septembre 2009 modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain en ce qui concerne les médicaments de thérapie innovante Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. :10.
107. 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 - Déclaration de la Commission [Internet]. 106, 32001L0018 avr 17, 2001. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/18/oj/fra>
108. Directive 2009/41/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (refonte) (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. 125, 32009L0041 mai 21, 2009. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/41/oj/fra>
109. Arrêté du 28 mars 2012 relatif au dossier technique demandé pour les utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés prévu aux articles R. 532-6, R. 532-14 et R. 532-26 du code de l'environnement - Légifrance [Internet]. [cité 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000025669331/>
110. Haut Conseil des Biotechnologies. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés [Internet] 2014 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.esst-inrs.fr/3rb/ressources/manuel\\_hcb\\_2014.pdf](https://www.esst-inrs.fr/3rb/ressources/manuel_hcb_2014.pdf)
111. ANSM. Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain [Internet] 2019 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/\(offset\)/4](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/(offset)/4)
112. Honeyman training. EU GMP Annex 1 Revision 2020, Manufacture of Sterile Medicinal Products [Internet] 2020 [page consultée le 28 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.honeymangroup.com/training/articles/annex-1-revision-2020/>
113. American Pharmaceutical Review. Establishing a Contamination Control Strategy/Program: From Global Development to Site Implementation [Internet] 2020 [page consultée le 28 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/564173-Establishing-a-Contamination-Control-Strategy-Program-From-Global-Development-to-Site-Implementation/>
114. European Commission. Guidelines on Good Manufacturing Practice Specific to Advanced Therapy Medicinal Products [Internet] 2017 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017\\_11\\_22\\_guidelines\\_gmp\\_for\\_atmps.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf)
115. A3P - Industrie Pharmaceutique & Biotechnologie. Mode campagne, une avancée sur la productivité des isolateurs [Internet] 2020 [page consultée le 28 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.a3p.org/productivite-mode-campagne/>
116. Pelzer Y. Nettoyage et désinfection des équipements de conditionnement : enjeux, problématiques et solutions d'amélioration continue sur un site de fabrication de produits pharmaceutiques et cosmétiques. [Thèse d'exercice] Université Toulouse III Paul Sabatier - Faculté des sciences pharmaceutiques ; 2018.
117. Pharmacopée européenne - Monographie 5.2.8. Minimising the risk of transmitting TSE via medicinal products [Internet] [page consultée le 30 mars 2021]. Disponible sur: [http://library.nju.cm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/05\\_general\\_texts/5.2.\\_general\\_texts\\_on\\_vaccines/5.2.8.%20cts.pdf](http://library.nju.cm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/05_general_texts/5.2._general_texts_on_vaccines/5.2.8.%20cts.pdf)

118. GoldBio. What is a BSE/TSE Certificate and Why Should You Care? [Internet] [page consultée le 30 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.goldbio.com/articles/article/what-is-a-bsetse-certificate-and-why-should-you-care>
119. European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition [Internet] [page consultée le 30 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>
120. EMA. Guidelines relevant for advanced therapy medicinal products [Internet] 2018 [page consultée le 30 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/advanced-therapies/guidelines-relevant-advanced-therapy-medicinal-products>
121. ICH Official web site [Internet] [page consultée le 30 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ich.org/>
122. EMA. Committee for Advanced Therapies (CAT) [Internet].2018 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-advanced-therapies-cat>
123. Blessing D, Vachey G, Pythoud C, Rey M, Padrun V, Wurm FM, et al. Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 22 nov 2018;13:14-26.
124. Robert M-A, Chahal PS, Audy A, Kamen A, Gilbert R, Gaillet B. Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms. *Biotechnol J.* mars 2017;12(3).
125. EMA. Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors [Internet] 2010 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-quality-non-clinical-clinical-issues-related-development-recombinant-adeno\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-quality-non-clinical-clinical-issues-related-development-recombinant-adeno_en.pdf)
126. Merten O-W, Gény-Fiamma C, Douar AM. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther.* oct 2005;12(S1):S51-61.
127. Collaco RF, Cao X, Trempe JP. A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene.* 1 oct 1999;238(2):397-405.
128. Vuksanaj K. Standardized Plasmid DNA Available On-Demand [Internet]. *GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News.* 2019 [cité 27 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.genengnews.com/sponsored/standardized-plasmid-dna-available-on-demand/>
129. Drug Development and Delivery. AAV vector manufacturing - Challenges & Opportunities in the Manufacturing of AAV Vectors Used in the Delivery of Gene Therapy Treatments [Internet]. 2017 [page consultée le 14 juill 2020]. Disponible sur: <https://drug-dev.com/aav-vector-manufacturing-challenges-opportunities-in-the-manufacturing-of-aav-vectors-used-in-the-delivery-of-gene-therapy-treatments/>
130. Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther.* févr 2016;24(2):287-97.
131. Clément N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol Ther - Methods Clin Dev.*2016;3,16002
132. Liu X, Voulgaropoulou F, Chen R, Johnson PR, Clark KR. Selective Rep-Cap gene amplification as a mechanism for high-titer recombinant AAV production from stable cell lines. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* oct 2000;2(4):394-403.
133. Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther.* juin 2008;15(11):840-8.
134. Nature Research. A helping hand for gene therapy production [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/d42473-018-00113-0>
135. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther.* 1 nov 2002;13(16):1935-43.
136. Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol.* déc 1992;66(12):6922-30.



137. Virag T, Cecchini S, Kotin RM. Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy. *Hum Gene Ther.* août 2009;20(8):807-17.
138. Genscript. Customized Insect Expression Package [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.genscript.com/insect-customized-expression-package.html>
139. Aslanidi G, Lamb K, Zolotukhin S. An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mars 2009;106(13):5059-64.
140. Ministère de la culture. Journal officiel du 15/09/2013. Définition d'une lignée cellulaire du ministère de la culture [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.culture.fr/franceterme/terme/COGB125>
141. EMA. ICH Q5D Derivation and characterisation of cell substrates used for production biotechnological/biological products [Internet] 2018 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnologicalbiological>
142. Pharmacopée européenne. Monographie 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/05\\_general\\_texts/5.2.\\_general\\_texts\\_on\\_vaccines/5.2.3.%20Cell%20substrates%20for%20the%20production%20of%20vaccines%20for%20human%20use.pdf](http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/05_general_texts/5.2._general_texts_on_vaccines/5.2.3.%20Cell%20substrates%20for%20the%20production%20of%20vaccines%20for%20human%20use.pdf)
143. EMA. ICH Q5A (R1) Quality of biotechnological products: viral safety evaluation biotechnology products derived from cell lines human or animal origin [Internet] 2018 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5a-r1-quality-biotechnological-products-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived>
144. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol.* 1 nov 2016;36(6):1110-22.
145. Rumachik NG, Malaker SA, Poweleit N, Maynard LH, Adams CM, Leib RD, et al. Methods Matter: Standard Production Platforms for Recombinant AAV Produce Chemically and Functionally Distinct Vectors. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* sept 2020;18:98-118.
146. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* juill 1977;36(1):59-74.
147. ATCC. 293T (ATCC ® CRL-3216™) Homo sapiens embryonic kidney [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-3216.aspx?geo\\_country=fr#](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-3216.aspx?geo_country=fr#)
148. Hitchcock T. Manufacturing Plasmid DNA: Ensuring Adequate Supplies for Gene and Cell Therapies [Internet]. 2016 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/manufacturing-plasmid-dna-ensuring-adequate-supplies-gene-cell-therapies/>
149. The National Institute for Innovation in Manufacturing Biopharmaceuticals. Gene therapy roadmap [Internet] [page consultée le 1 août 2020]. Disponible sur: [https://delawarebio.org/wp-content/uploads/2018/12/NIIMBL\\_GENE-THERAPY-ROAD-MAP-2.pdf](https://delawarebio.org/wp-content/uploads/2018/12/NIIMBL_GENE-THERAPY-ROAD-MAP-2.pdf)
150. Addgene. Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term Storage of Plasmids [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/>
151. Hitchcock T. Manufacturing of AAV Vectors for Gene Therapy [Internet] 2017 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.genengnews.com/magazine/297/manufacturing-of-aav-vectors-for-gene-therapy/>
152. ThermoFisher Scientific. Cell Factory Systems [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/bioproduction/single-use-bioprocessing/adherent-cell-culture-solutions/cell-factory-systems.html>
153. Hildinger M, Baldi L, Stettler M, Wurm FM. High-titer, serum-free production of adeno-

associated virus vectors by polyethyleneimine-mediated plasmid transfection in mammalian suspension cells. *Biotechnol Lett.* nov 2007;29(11):1713-21.

154. Sartorius Bioreactors and fermenters [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.sartorius.com/en>

155. Cytiva. ReadyToProcess WAVE 25 Rocker [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/rocking-bioreactors/systems/readytoprocess-wave-25-rocker-p-05542>

156. Wright JF. Transient Transfection Methods for Clinical Adeno-Associated Viral Vector Production. *Hum Gene Ther.* juill 2009;20(7):698-706.

157. Rooij J de, DeConto J, Schaenzler G, Bauer D, Barre K, Duskin M, et al. Upstream and downstream solutions for AAV manufacturing. *Cell Gene Ther Insights.* 2 août 2019;5(S5):1017-29.

158. Mingozi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JEJ, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med.* avr 2007;13(4):419-22.

159. Terova O, Soltys S, Hermans P, De Rooij J, Detmers F. Overcoming Downstream Purification Challenges for Viral Vector Manufacturing: Enabling Advancement of Gene Therapies in the Clinic. *Cell Gene Ther Insights.* 14 mars 2018;4(2):101-11.

160. Cell and gene therapy insights. AAV vector process development: achieving high purity and high yield - experiences from the frontline. [Internet] [page consultée le 14 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.insights.bio/immuno-oncology-insights/journal/article/659/aav-vector-process-development-achieving-high-purity-and-high-yield-experiences-from-the-frontline>

161. BioProcess International. Innovative Downstream Purification Solutions for Viral Vectors: Enabling Platform Approaches to Advance Gene Therapies [Internet] 2016 [page consultée le 14 juill 2020]. Disponible sur: <https://bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/innovative-downstream-purification-solutions-viral-vectors-enabling-platform-approaches-advance-gene-therapies/>

162. Potter M, Lins B, Mietzsch M, Heilbronn R, Van Vliet K, Chipman P, et al. A simplified purification protocol for recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 13 août 2014;1:14034.

163. Qu W, Wang M, Wu Y, Xu R. Scalable Downstream Strategies for Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Light of the Properties. *Curr Pharm Biotechnol.* août 2015;16(8):684-95.

164. Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, Samanta A, Toelen J, Debyser Z, et al. Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Hum Gene Ther.* oct 2010;21(10):1259-71.

165. Wright JF, Qu G, Tang C, Sommer JM. Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector. *Curr Opin Drug Discov Devel.* mars 2003;6(2):174-8.

166. Wright JF, Le T, Prado J, Bahr-Davidson J, Smith PH, Zhen Z, et al. Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* juill 2005;12(1):171-8.

167. Bencicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zelenia O, et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* mars 2008;16(3):458-65.

168. Buclez P-O, Dias Florencio G, Relizani K, Beley C, Garcia L, Benchaouir R. Rapid, scalable, and low-cost purification of recombinant adeno-associated virus produced by baculovirus expression vector system. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 11 mai 2016;3:16035.

169. PDA. Points to consider for aseptic processing. *PDA J Pharm Sci Technol.* avr 2003;57(2 Suppl):1-72.

170. Heloury J. Comparaison de 3 procédés aseptiques (manuel, semi-automatique et robotique) de la production des médicaments injectables stériles au CHU de Bordeaux : évaluation de la productivité et réalisation d'une analyse de risque [Thèse d'exercice] Université de Limoges; 2019

171. Hemedis. Mibmix® Compounder C12 [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible

sur: <https://www.hemedis.com/en/MIBMIX-Compounder-C12/>

172. Verderflex. Verderflex® Vantage 3000 [Internet] 2014 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <http://verderflex.com/fr/pompes-peristaltiques-avec-boitier-verderflex-vantage-3000>

173. Aseptic Technologies. Introduction to Crystal® closed vial technology [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.papservices.co.uk/wp-content/uploads/2013/03/2010.11.02.-Aseptic-Technologies.pdf>

174. Industrie Pharma. Mirage : Les industriels maîtrisent toutes les solutions techniques existantes. [Internet] 2016 [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: [/mirage-les-industriels-maitrisent-toutes-les-solutions-techniques-existantes,73670](#)

175. ThermoFisher Scientific. Guide to Fetal Bovine Serum in Vaccine Production [Internet]. [page consultée le 10 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics/guide-to-fetal-bovine-serum-vaccine-production.html>

176. Sigma-Aldrich. Comparison of Greener Detergents in Mammalian Cell Lysis & Downstream Applications [Internet] [page consultée le 5 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/3/greener-detergents-in-mammalian-cell-lysis-app-note-mk.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/3/greener-detergents-in-mammalian-cell-lysis-app-note-mk.pdf)

177. European Chemicals Agency. Comprendre REACH [Internet] [page consultée le 10 avr 2021]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/regulations/reach/understanding-reach>

178. European Chemicals Agency. Triton - Substance Information [Internet] [page consultée le 10 avr 2021]. Disponible sur: <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.150.360>

179. Bae DH, Marino M, Iaffaldano B, Fenstermaker S, Afione S, Argaw T, et al. Design and Testing of Vector-Producing HEK293T Cells Bearing a Genomic Deletion of the SV40 T Antigen Coding Region. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 11 sept 2020;18:631-8.

180. Hein J, Boichuk S, Wu J, Cheng Y, Freire R, Jat PS, et al. Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *J Virol.* janv 2009;83(1):117-27.

181. Bourge E, Dufour-Goncalves D, Diederichs A, Oubaidour Rahimane MA, Cheuzeville J, Lecomte C, et al. PTG1plus, a novel transfection agent for a better AAV productivity in large-scale bioreactors. *ESGCT 27th annual congress 2019.*

182. BioInsights. FectoVIR®-AAV, the new tool to enhance recombinant AAV production for gene therapy [Internet] 2021 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.insights.bio/cell-and-gene-therapy-insights/webinars/228/FectoVIR-AAV-the-new-tool-to-enhance-recombinant-AAV-production-for-gene-therapy>

183. Polyplus Transfection. FectoVIR®-AAV for AAV virus production in suspension cells [Internet] [page consultée le 3 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.polyplus-transfection.com/products/fectovir-aav/>

184. Polyplus Transfection. FectoVIR®-AAV a giant step for AAV large scale manufacturing [Internet] 2020 [page consultée le 3 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.polyplus-transfection.com/blog/webinar-fectovir-aav/>

185. Cell and gene therapy insights. Scaling up/out: cost-effective & robust transitioning through the clinic to commercial manufacture [Internet] 2020 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://bioinsightscdn.blob.core.windows.net/uploads/attachments/OXGENE%201018609cgti2020127.pdf>

186. Schofield M. Empty/full separation: gene therapy's hidden challenge. *Cell Gene Ther Insights.* 29 janv 2021;6(11):1715-22.

187. BioProcess International. AAV Manufacturing: Herpes-Assisted Expansion [Internet] 2020 [page consultée le 3 avr 2021]. Disponible sur: <https://bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/viral-vectored-gene-therapies-harnessing-their-potential-through-scalable-reproducible-aav-manufacturing-processes/>

188. BioInsights. Identifying the critical factors for commercial-scale viral vector process development and manufacturing [Internet] 2020 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.insights.bio/cell-and-gene-therapy-insights/webinars/204/Identifying-the-critical-factors-for-commercial-scale-viral-vector-process-development-and-manufacturing>
189. BioInsights. Ensuring viral vector and gene therapy commercial readiness [Internet] 2020 [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.insights.bio/cell-and-gene-therapy-insights/journal/article/1508/Ensuring-viral-vector-and-gene-therapy-commercial-readiness>
190. Legmann R, Collard F. Viral Vector Manufacturing and Transfection Efficiency in the iCELLis® Bioreactor System. :13.
191. Pall. iCELLis® Bioreactor [Internet] [page consultée le 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://shop.pall.co.uk/uk/en/biotech/cell-culture/bioreactors/zidhw7uq211>
192. Warneck L. Ensuring Viral Vector Supply for Gene Therapies [Internet] 2020 [page consultée le 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.labiotech.eu/partner/ensuring-viral-vector-supply-gene-therapies/>
193. Nau J-Y. À quel prix le Zolgensma®, le médicament le plus cher du monde, sera-t-il vendu en France ? [Internet] 2019 [page consultée le 11 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.slate.fr/story/178845/sante-medicaments-zolgensma-novartis-avexis-fixation-prix-transparence>
194. Adamson-Small L, Lundgren M, Guterstam P. Scalable and efficient AAV production process with new Fibro chromatography technology. :14.
195. Aldevron. GMP Plasmid DNA [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.aldevron.com/platforms/plasmid-dna-production/gmp-plasmid-dna>
196. Genetic Engineering and Biotechnology News. Insights from an Industry Forum: Reducing Cost of Goods for Gene Therapy [Internet] 2020 [page consultée le 5 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.genengnews.com/sponsored/insights-from-an-industry-forum-reducing-cost-of-goods-for-gene-therapy/>
197. BioInsights. Stable AAV producer cell lines: elevating vector manufacturing [Internet] [page consultée le 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.insights.bio/cell-and-gene-therapy-insights/webinars/171/Stable-AAV-producer-cell-lines-elevating-vector-manufacturing>
198. Cytiva. AVB Sepharose High Performance [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins/affinity-specific-groups/avb-sepharose-high-performance-p-05953>
199. ThermoFisher Scientific. POROS™ CaptureSelect™ AAVX Affinity Resin [Internet] [page consultée le 31 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A36741>
200. Downstream column. Cellulose Fiber-based Chromatography Increases Flexibility and Throughput in Antibody Purification [Internet] 2020 [page consultée le 3 avr 2021]. Disponible sur: <https://downstreamcolumn.com/cellulose-fiber-based-chromatography-increases-flexibility-throughput-antibody-purification/>
201. Cytiva. New KUBio box for viral vectors boosts gene therapy manufacturing [Internet] [page consultée le 5 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/kubio-box-launch-10001>

## SERMENT DE GALIEN

Je jure 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 ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



## **PIQUENOT Mathilde**

### **Les enjeux de la production industrielle des médicaments de thérapie génique : cas des vecteurs viraux rAAV**

Th. D. Pharm., Rouen, 2020, 124 p.

---

#### **RESUME**

Les maladies génétiques sont des maladies rares, souvent difficiles à diagnostiquer, et pour la plupart encore incurables à l'heure actuelle. La seule façon de guérir durablement une maladie génétique est en effet de corriger le gène défectueux du patient. Grâce aux progrès considérables réalisés dans les domaines de la génétique et de la biologie moléculaire, le concept du gène-médicament s'est concrétisé, avec les premiers essais cliniques de thérapie génique dans les années 1990, et la mise sur le marché du premier médicament de thérapie génique en 2012. Depuis, le nombre d'essais cliniques mettant en jeu des vecteurs viraux connaît une augmentation très importante, entraînant une augmentation de la demande de production, défi auquel doivent faire face les industriels. Le développement de systèmes de production et de purification capables de générer des quantités suffisantes de vecteurs, et du niveau de qualité requis, est un enjeu de taille pour répondre à cette demande croissante et maîtriser les coûts de production, facilitant ainsi l'accessibilité aux médicaments de thérapie génique.

---

**MOTS CLES** : Thérapie génique – Vecteurs viraux – Production – Enjeux industriels

---

#### **JURY**

Président : Mr VERITE Philippe, PU

Membres : Mr MARTINET Jérémie, MCU-PH

Mr EL GUEDDARI Morad, pharmacien – ingénieur

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 21 mai 2021