



Académie nationale
de médecine
Fondée en 1820

Le passage à l'échelle industrielle de la production de cellules souches hu- maines à usage thérapeutique

Rapport conjoint des deux Académies

Décembre 2017

©Académie des technologies- septembre 2017
Grand Palais des Champs-Élysées - Porte C
Avenue Franklin D. Roosevelt - 75008 Paris
+33(0)1 53 85 44 44
secretariat@academie-technologies.fr
www.academie-technologies.fr
ISBN : 979-10-97579-05-0

Rédacteurs

Raymond ARDAILLOU (Académie nationale de médecine),
Bruno JARRY (Académie des technologies),
Jean-François STOLTZ (Académie nationale de médecine).

Au nom d'un groupe de travail

Raymond ARDAILLOU,
Pierre-Étienne BOST,
Jacques CAEN,
Nathalie CARTIER-LACAVE,
Jean-Pierre CAZENAVE,
Bernard DAUGERAS,
Luc DOUAY,
Zhong Chao HAN,
Bruno JARRY,
Jean-Yves LE GALL,
Jean-Émile LUNEL,
Patrick NETTER,
Jean-François STOLTZ.

Personnalités auditionnées

Anne d'ANDON, Dr., HAS, chef du service d'évaluation des médicaments.

Lotfi BOUDALI, ANSM, directeur adjoint des médicaments en oncologie, hématologie, transplantation, néphrologie, des produits de thérapie cellulaire, tissus et produits sanguins labiles.

Bernard DAUGERAS, président d'Auriga Partners.

Luc DOUAY, Pr., université Pierre et Marie Curie (Centre de recherches Saint-Antoine), président et directeur scientifique d'EryPharm.

Patrick GÉNISSEL, groupe Servier, Directeur général Biopharmacie.

Loïc GUILLEVIN, Pr., HAS, président de la Commission de transparence.

Zhong Chao HAN, Pr., président de Beijing Health-Biotech.

Zhihai HAN, directeur R & D de Beijing Health-Biotech.

Philippe HÉNON, Pr., président de CellProthera (l'Institut de recherche en hématologie et transplantation à Mulhouse).

Jean-Jacques LATAILLADE, Pr., chef de département recherche et thérapie cellulaire de l'hôpital militaire Percy.

Jacques LECLAIRE, directeur scientifique de L'Oréal Recherche & Innovation.

Pierre-Noël LIRSAC, président de CELLforCURE du Groupe LFB (Laboratoire de Fractionnement Biologique).

Olivier NOSJEAN, groupe Servier, Directeur de Biotechnologie moléculaire et pharmacologie cellulaire.

Marc PECHANSKI, Pr., directeur scientifique de l'I-Stem (Inserm).

Frédéric REVAH, directeur général de Genethon.

Guillaume ROUSSEAU, directeur R & D d'Erypharm.

Isabelle SAINTE-MARIE, ANSM, chef de produit hémovigilance, produits sanguins labiles, thérapie cellulaire et produits radio-pharmaceutiques.

Jean-François STOLTZ, Pr., CHU de Nancy.

Sommaire

L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE	6
L'ACADÉMIE DES TECHNOLOGIES	7
RÉSUMÉ	9
SUMMARY	11
INTRODUCTION	13
LES TRAVAUX ACADÉMIQUES AYANT ABOUTI À L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES CHEZ L'HOMME À DES FINS THÉRAPEUTIQUES	15
COMMENT PASSER DES ÉTUDES ACADÉMIQUES À LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE CELLULES SOUCHES	29
LES CONTRAINTES RÉGLEMENTAIRES RELATIVES AUX MÉDICAMENTS DE THÉRAPIE CELLULAIRE EN FRANCE	41
RECOMMANDATIONS	49
RÉFÉRENCES	53
ABRÉVIATIONS	59

L'Académie nationale de médecine

Héritière de l'Académie royale de chirurgie fondée en 1731 par Louis XV et de la Société royale de médecine fondée en 1778 sous Louis XVI, l'Académie royale de médecine a été créée à l'initiative du baron Portal, par Louis XVIII, indépendamment des quatre Académies déjà existantes à l'Institut de France.

Par une décision du 29 janvier 1947, elle devient Académie nationale de médecine. L'Académie est une institution publique. Les statuts de l'Académie sont définis par l'article 110 de la Loi N° 2013-660 du 22 juillet 2013 dont nous donnons ci-dessous les dispositions principales :

L'Académie nationale de médecine est une personne morale de droit public à statut particulier, placée sous la protection du Président de la République.

Elle a pour mission de répondre, à titre non lucratif, aux demandes du Gouvernement sur toute question concernant la santé publique et de s'occuper de tous les objets d'étude et de recherche qui peuvent contribuer aux progrès de l'art de guérir.

La compagnie réunit des médecins, des chirurgiens, des biologistes, des pharmaciens et des vétérinaires reconnus pour leurs travaux scientifiques et pour les responsabilités qu'ils ont assumées dans le domaine de la santé. Depuis sa création, l'Académie a compté onze membres nationaux lauréats du Prix Nobel.

Son indépendance et la pertinence de ses rapports et communications lui confèrent une place originale et un rôle important dans le domaine de la santé.

L'Académie des technologies

Dès 1982, l'académie des sciences avait créé en son sein un Conseil pour les applications de l'Académie des sciences (Cadas). Ce conseil réunissait des académiciens et des personnalités choisies pour leurs contributions aux applications des sciences dans tous les domaines (industriel, militaire, société civile). Il présentait ainsi l'originalité de réunir, à parité, des personnalités du monde de la recherche universitaire et du monde industriel et économique

Il est apparu pertinent à la fin des années 1990 d'ériger ce conseil en Académie de plein exercice, à l'image des nombreuses Académies des technologies existant tant en Europe que dans bien d'autres pays, certaines établies de longue date, d'autres plus récemment (actuellement plus d'une vingtaine en Europe seulement).

C'est ainsi que l'Académie des technologies a été créée au 1^{er} janvier 2000. Elle a été constituée *ab initio* des membres de l'Académie des sciences souhaitant être également membres de cette nouvelle Académie et des personnalités extérieures membres du Cadas. Initialement association loi de 1901, elle s'est dotée d'un règlement intérieur, spécifiant son organisation et son mode de recrutement. Elle est devenue en 2006 un établissement public et en 2013 elle a été placée sous protection du Président de la République.

Elle comporte actuellement près de 200 membres titulaires et 135 membres émérites (membres âgés de plus de 72 ans). Elle élit chaque année une douzaine de membres provenant des horizons les plus divers. C'est cette diversité qui lui permet d'aborder les grands thèmes sociétaux transverses induits par l'introduction rapide dans nos sociétés des nouvelles technologies.

L'Académie propose aux autorités gouvernementales et à la société civile sur chaque sujet des grilles de lecture permettant l'évaluation des choix scientifiques et technologiques à faire. L'Académie s'implique aussi dans un dialogue constructif entre les parties prenantes.

Elle s'est dotée d'une devise *Pour un progrès raisonné, choisi et partagé* qui explicite bien sa vocation et son ambition de médiateur entre la science et la société civile.

Pour réaliser sa mission elle est organisée en une douzaine de commissions, qui peuvent créer en tant que de besoin des groupes de travail pour traiter un sujet spécifique. Les rapports issus de ces groupes sont évalués rigoureusement en interne et soumis au vote de l'ensemble des académiciens avant leur publication.

Ces commissions sont soutenues par l'équipe permanente, par les comités des travaux et de la qualité, le délégué aux publications. Enfin, une commission spécifique anime la réflexion éthique indispensable qui pénètre l'ensemble des travaux de la Compagnie.

Résumé

La production de cellules souches pour le traitement des maladies humaines, initiée dans les laboratoires de recherche, est en voie d'être reprise par l'industrie pharmaceutique dont l'objectif est de développer des médicaments de thérapie innovante (MTI) dépourvus d'effets néfastes, homogènes, reproductibles, en quantité suffisante et de coût raisonnable. L'utilisation thérapeutique des cellules souches a débuté avec les cellules souches hématopoïétiques humaines (HSC), médullaires et du sang du cordon, dans le traitement des aplasies, des leucémies et des maladies génétiques hématologiques. Elle s'est développée avec les cellules souches mésenchymateuses (MSC) produites en faible quantité par la moelle, mais aussi d'autres tissus, utilisées après isolement et culture. Des succès thérapeutiques ont été obtenus dans diverses affections cardiaques et cutanées grâce à leurs propriétés sécrétoires paracrines de facteurs de croissance. Un grand pas a été effectué avec l'usage des cellules souches pluripotentes embryonnaires (ESC) ou induites (iPS). Les premières du fait des limites apportées par les lois de bioéthique et des risques de cancérogenèse ont été utilisées uniquement de façon isolée après différenciation, soit dans un but thérapeutique, soit dans le criblage *in vitro* de médicaments. Les iPS sont produites à partir de cellules adultes après reprogrammation et différenciation, puis utilisées à titre autologue chez le donneur lui-même, ou allogénique chez d'autres sujets, la deuxième condition permettant seule une production de masse. Le passage à la phase industrielle de la production nécessite d'utiliser des équipements adéquats (bioréacteur) et de respecter les bonnes pratiques de fabrication lors des phases finales de

préparation. Le marché mondial croît chaque année surtout pour le traitement des maladies chroniques répandues (dégénérescence maculaire, arthrose, nécrose cardiaque, ulcères diabétiques...). La France dispose d'une dizaine de sociétés impliquées dans la préparation de ces MTI, et quelques essais thérapeutiques, encore limités aux phases I et I/II, ont été réalisés. Pour faciliter le développement de *start ups*, quelques pays ont encouragé des approches partenariales entre les différents acteurs impliqués en montant des plateformes public-privé. La propriété intellectuelle des procédés est assurée par la prise de brevet qui reste impossible pour les cellules mêmes. Les résultats des essais thérapeutiques, même non concluants, devraient être accessibles sur un site ouvert à tous. Les contraintes réglementaires relatives aux MTI et aux MTI préparés ponctuellement relèvent de directives européennes après leur transcription dans la législation française. La fabrication des MTI obéit aux bonnes pratiques définies par la réglementation. Leur évaluation avant leur mise sur le marché dépend de L'Agence européenne des médicaments. Les deux Académies recommandent l'assouplissement de la réglementation et l'accélération des procédures afin de faciliter la production de MTI à base de cellules souches ainsi que diverses mesures destinées à aider à la création de *start-ups* spécialisées, en particulier la mise en place de centres de recherche collaborative pour les accompagner dans les domaines techniques et réglementaires.

Summary

In recent years, the production of stem cells for the treatment of human diseases has moved from the research laboratories to the pharmaceutical industry, with the aim of developing homogeneous and reproducible, innovative therapeutic medicines (ITM) without harmful effects, in sufficient quantities and of reasonable cost. The therapeutic use of stem cells began with human medullary and cord blood hematopoietic stem cells (HSC) in the treatment of aplasias, leukemias and hematological genetic diseases. It developed with the mesenchymal stem cells (MSC) produced in small quantities by the bone marrow, but also other tissues, and utilized after isolation and culture. Therapeutic successes were obtained in various cardiac and cutaneous diseases thanks to their secretory properties of growth factors. A major step was taken with the use of embryonic (ESC) or induced pluripotent stem cells (iPS). The former, due to the limitations of bioethics and to tumor developing risks, have been used, after isolation and differentiation, either in rare therapeutic purposes or for the *in vitro* screening of drugs. iPS are produced from adult cells after reprogramming and differentiation. They have been utilized for the treatment of various diseases in autologous or allogeneic form, this second condition being necessary to allow mass production. The transition to the industrial phase of production requires to use adequate equipment (bioreactors) and to respect the good manufacturing practices in the final stages of preparation. The market grows every year especially for the treatment of widespread chronic diseases (macular degeneration, arthrosis, cardiac necrosis, diabetic ulcers...). France has about ten companies involved in the preparation of

these ITMs and some limited therapeutic trials in Phase I and I / II have been carried out. To facilitate the development of start-ups, some countries have developed partnership approaches in setting up public-private platforms. The intellectual property of the processes is ensured by the patent taking which remains impossible for the cells themselves. Leaving aside the exceptional use of ESC in industrial applications, the main remaining question is the sharing of the results of the therapeutic trials, even if not successful, on a web site open to everybody. Regulatory constraints relating to ITMs and ITMs prepared for a single patient are subject to European directives after their transcription into French legislation. The manufacture of ITMs is based on good manufacturing practices and their evaluation before they are placed on the market depends on the European Medicine Agency. Both Academies recommend easing of the legislation and accelerated procedures to facilitate the production of stem cell-based MTIs as well as various measures aiming to the creation of specialized start-ups, in particular the implementation of collaborative research centers to assist them in technical and regulatory matters.

Introduction

L'étude des cellules souches s'est d'abord limitée à des études académiques effectuées dans des laboratoires de recherche [1]. Les potentialités d'auto-renouveau et de différenciation de ces cellules ont suscité un intérêt considérable et fait rapidement envisager des applications thérapeutiques chez l'homme. Jusqu'à récemment, ces applications se sont bornées au traitement des maladies du sang (leucémies, aplasies médullaires) par es greffes de cellules de la moelle osseuse et à celui des brûlures par les greffes de peau. Depuis peu de temps, l'utilisation des cellules souches a pris un nouvel essor avec les progrès de la biologie de la reproduction et la possibilité d'en créer à partir de cellules matures. De nouvelles indications sont apparues, comme les traitements de la dégénérescence maculaire de la rétine et de l'infarctus du myocarde qui ont été essayés chez un nombre limité de malades dans des hôpitaux publics en association avec les laboratoires préparant les cellules à administrer. En parallèle, les cellules souches ont été utilisées *in vitro*, après différenciation en cellules d'organes variés, pour mieux analyser le métabolisme cellulaire chez les patients atteints de maladies génétiques et cribler des médicaments. Des brevets ont souvent été pris à l'initiative des chercheurs par les administrations responsables des laboratoires de recherche ; mais le passage à l'échelle industrielle, c'est-à-dire la production de médicaments de thérapie innovante (MTI) aux normes pharmaceutiques aboutissant à la mise sur le marché d'un produit sans danger, homogène, efficace et d'un prix raisonnable est encore à ses débuts. Un signe encourageant est la multiplication des jeunes pousses (start-ups) que créent, dans ce but, des chercheurs en poste

à l'université ou dans les organismes publics de recherche. On doit souligner ici l'ouverture apportée par la loi N° 99-587 du 12 juillet 1999 sur l'innovation et la recherche, dite *Loi Allègre*, qui a facilité le passage des chercheurs à une activité privée. L'Académie des technologies et l'Académie nationale de médecine ont jugé opportun d'analyser la situation présente dans notre pays et de formuler des recommandations permettant de l'améliorer. Ce rapport commence par le rappel des travaux académiques effectués qui sont à la base du développement industriel. Le chapitre suivant envisagera la situation présente et les problèmes que pose ce développement. Il sera suivi par l'examen des obstacles rencontrés et de la réglementation en vigueur. Enfin, nous ferons état des recommandations des deux Académies.

Les travaux académiques ayant abouti à l'utilisation des cellules souches chez l'homme à des fins thérapeutiques

Ces travaux ont d'abord porté sur les cellules multipotentes, c'est-à-dire capables de se différencier en un nombre limité de types cellulaires donnés, puis sur les cellules pluripotentes embryonnaires et induites capables de se différencier dans tous les types cellulaires de l'organisme humain.

Cellules multipotentes de la moelle osseuse et du sang du cordon

Les premières cellules souches utilisées en thérapeutique ont été celles de la moelle osseuse. En 1958, Georges Mathé et son équipe qui travaillaient déjà sur la reconstitution de la moelle osseuse par injection de moelle allogénique chez des souris irradiées appliquèrent cette technique à des physiciens irradiés accidentellement en Yougoslavie [2]. Ce traitement guérit quatre malades sur six, ce qui eut un retentissement mondial et fut le prélude à son application chez les patients leucémiques. Dès 1963 en effet, Georges Mathé et son équipe effectuèrent avec succès une greffe de moelle osseuse chez un patient leucémique préalablement irradié [3]. Ils montrèrent que la disparition des cellules tumorales n'était pas due qu'à l'irradiation, mais aussi à leur destruction par

les cellules T¹ du greffon. Ce dernier effet n'épargne pas les cellules normales de l'organisme receveur et est appelé « réaction du greffon contre l'hôte » ou plus communément GVH (« Graft Versus Host »). De nos jours, l'irradiation est remplacée par la chimiothérapie et la GVH prévenue en utilisant comme donneur un sujet de groupe HLA (« Human Leucocyte Antigen ») compatible et en traitant le receveur par des médicaments immunosuppresseurs.

Les cellules souches de la moelle osseuse appartiennent à deux types.

Les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic Stem Cells ; HSC)

Elles se différencient en chacune des variétés de cellules sanguines et sont capables de se dupliquer selon deux modes différents, un classique, symétrique (qui génère deux cellules souches) et un asymétrique, qui génère, d'une part, un progéniteur, cellule plus différenciée à l'origine des érythrocytes, leucocytes et plaquettes, et de l'autre, une cellule souche ;

Les cellules souches stromales mésenchymateuses (Mesenchymal Stem Cells ; MSC)

Elles sont d'origine mésodermique et peu nombreuses (0,001 à 0,01 % des cellules nucléées), mais douées de potentialités multiples parce que capables de se différencier en d'autres types cellulaires que les cellules du sang. Les cellules de la moelle autrefois prélevées par ponction directement dans la moelle osseuse le sont maintenant à partir de sang dit « mobilisé » obtenu chez le donneur après administration de *Granulocyte Colony-Simulating Factor* (GCSF) qui facilite la sortie de ces cellules des niches, hématopoïétiques et mésenchymateuses, qui les contiennent. La présence d'un marqueur spécifique, l'antigène CD 34, permet de les identifier. À la greffe des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, s'est ajoutée en 1989 la greffe des cellules du sang du cordon et du placenta qu'ont utilisée avec succès Eliane Gluckman et son équipe pour soigner un enfant atteint d'anémie de Fanconi (4). Depuis, le sang du cordon est collecté à la naissance chez de nombreux

1 Cellules T : Lymphocytes provenant du thymus, acteurs de l'immunité cellulaire.

enfants. S'il contient un nombre suffisant de cellules souches hématopoïétiques, il est conservé et stocké dans des banques publiques spécialisées et est utilisé uniquement pour des greffes allogéniques de façon anonyme et gratuite. Le sang de cordon a l'avantage d'entraîner moins de réactions du greffon contre l'hôte que les greffons d'origine médullaire, du fait de l'immaturité du système immunitaire à la naissance. Son principal inconvénient est que, pour assurer le succès de la greffe, le greffon doit contenir un nombre suffisant de cellules souches [5], ce qui pose problème pour les receveurs de plus de 50 kg chez lesquels deux échantillons de sang de cordon peuvent être nécessaires. En France, le traitement par les cellules souches hématopoïétiques de la moelle et du sang du cordon relève d'institutions publiques et est placé sous le contrôle de l'Agence de la biomédecine. Cette agence tient un registre appelé « France greffe de moelle » qui recense plus de 200 000 donneurs et, environ, 16 000 unités de sang de cordon dont les caractéristiques détaillées y sont colligées. Le registre est alimenté par un réseau national de centres donneurs, chargés d'inscrire et de gérer les donneurs volontaires, mais aussi de centres receveurs et greffeurs nationaux, responsables de l'inscription des patients. Tous ces centres sont reliés, en temps réel, au Registre national avec lequel ils collaborent au quotidien, pour une optimisation des recherches de donneurs de moelle osseuse et d'unités de sang de cordon. Le Registre national est, par ailleurs, relié à tous les registres internationaux, ce qui lui donne accès à près de 14 millions de donneurs et à 450 000 unités de sang de cordon. Des banques de conservation de sang de cordon créées à des fins de greffe autologue existent à l'étranger, mais sont interdites dans notre pays. La greffe de HSC est aujourd'hui largement utilisée en médecine, qu'il s'agisse du traitement de pathologies malignes ou de la correction d'un défaut génétique et de l'apport d'une protéine manquante dans le sang ou les tissus, y compris le cerveau. C'est, par exemple, le cas de maladies lysosomales comme la maladie de Gaucher ou peroxydomale comme l'adrénoleucodystrophie. La possibilité récente de modifier génétiquement les HSC de patients en utilisant un vecteur viral dérivé du VIH pour introduire le gène thérapeutique dans les propres HSC

des patients et de réaliser une autogreffe de ces cellules corrigées permet de traiter efficacement un nombre croissant de maladies génétiques sévères en évitant les complications graves de la greffe de donneur non compatible (6). Les HSC ont été également utilisées pour la production d'hématies in vitro (7). Comme ces cellules sont spécifiques du donneur, elles ouvrent la voie à une médecine personnalisée permettant de transfuser des patients alloimmunisés ou porteurs de phénotypes rares. D'une manière générale, la production in vitro d'hématies pourrait pallier le manque chronique de donneurs de sang. Les hématies proviennent de cellules souches « mobilisées » à partir de la moelle, puis recueillies dans le sang périphérique après avoir été identifiées par l'antigène CD34 et, enfin, cultivées dans des milieux de culture appropriés jusqu'à leur transformation en réticulocytes. Ces réticulocytes, après purification sont transfusés et se transforment rapidement in vivo en hématies matures. La qualité des hématies ainsi produites est confirmée par une durée de vie et une capacité de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine qu'elles contiennent, équivalentes à celles des cellules naturelles.

Les cellules souches mésenchymateuses

Ce sont des cellules multipotentes capables de se différencier en une variété de types cellulaires. Parties intégrantes des populations périvasculaires, elles sont présentes dans de très nombreux tissus de l'organisme comme le tissu adipeux, la moelle osseuse, et les tissus néonataux dont le placenta, le cordon ombilical et le sang qu'il contient. Elles sont habituellement prélevées dans le tissu adipeux, la moelle osseuse et le cordon. Elles peuvent être à l'origine, entre autres, de chondrocytes, d'ostéoblastes et d'adipocytes. Elles secrètent, aussi, localement, des facteurs de croissance actifs sur les cellules environnantes et sont peu immunogènes. Il vaut, cependant, mieux vérifier, que le receveur n'est pas porteur d'anticorps contre les antigènes HLA du donneur. De nombreux essais cliniques de thérapie cellulaire utilisant des MSC autologues ou allogéniques sont en cours dans le monde. Il s'agit toujours

de cellules purifiées et cultivées afin d'accroître leur nombre, très faible dans le prélèvement effectué. Les applications sont variées du fait des capacités de ces cellules à se différencier en plusieurs types cellulaires et à produire des facteurs de croissance. À titre d'exemple, citons l'utilisation des MSC médullaires autologues dans la réparation des tissus lésés, en particulier du myocarde après infarctus et de la peau après brûlure cutanée. Le traitement des infarctus et de l'insuffisance cardiaque a donné des résultats variables d'une étude à l'autre [8]. Des succès ont été obtenus dans le traitement des brûlures cutanées faisant suite à des irradiations. Dans ce cas, les MSC sont appliquées localement en association avec une greffe d'épiderme autologue [9]. Les progrès constatés dans la régénération des myocytes et des kératinocytes ont été attribués à un effet trophique, c'est-à-dire une croissance des cellules résiduelles sous l'effet des sécrétions paracrines des MSC, et non à une colonisation par multiplication des cellules greffées. L'ensemble du cordon, parois comprises (gelée de Wharton), a été également proposé comme source de cellules souches mésenchymateuses qui ont été utilisées dans le traitement de diverses affections dont les ulcères cutanés du diabétique [10].

3- Cellules pluripotentes embryonnaires humaines (*Embryonic Stem Cells* ; ESC).

Une nouvelle étape a été le passage des cellules souches multipotentes de la moelle et du sang du cordon aux cellules souches pluripotentes. Ces cellules possèdent deux propriétés cardinales :

- elles peuvent s'auto-renouveler indéfiniment ;
- elles peuvent donner naissance à l'ensemble des types cellulaires de l'organisme.

La première source de cellules souches pluripotentes humaines est constituée par les ESC. Elles proviennent d'embryons surnuméraires congelés obtenus au cours d'une fécondation *in vitro*. Lorsque ces embryons ne sont plus retenus pour un projet parental, ils peuvent, avec l'autorisation des géniteurs, être

utilisés à des fins de recherche. Les ESC sont prélevés au stade de blastocyste, c'est-à-dire 5 à 7 jours après la fécondation. Les ESC dérivent de la masse interne du blastocyste qui compte environ 50 cellules. Selon les conditions de culture, les ESC peuvent donner naissance à la quasi-totalité des cellules de l'organisme humain, tels les neurones et les cellules de la peau. Depuis la loi du 6 août 2013 modifiant la loi N° 2011-814 du 7 juillet 2011, la recherche sur l'embryon et les ESC est passée d'un régime d'interdiction avec dérogations (qui prévalait dans les lois relatives à la bioéthique de 2004 et 2011) à un régime d'autorisation encadrée. Ainsi, aucune recherche sur l'embryon humain ni sur les cellules souches embryonnaires ne peut être entreprise sans autorisation de l'Agence de la biomédecine. Celle-ci juge de la pertinence scientifique du projet, de sa finalité médicale, et du fait qu'elle ne peut être menée sans recourir à des embryons ou des cellules souches embryonnaires. Elle s'assure également que le protocole respecte les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires. La loi interdit la création d'embryons transgéniques ou chimériques de même que la conception *in vitro* d'embryons ou la constitution par clonage d'embryons humains à des fins de recherche. Aussi, les ESC ne sont-elles pas l'objet d'un développement industriel. Elles ont été toutefois utilisées *in vitro* pour la modélisation des maladies humaines, préalable indispensable au criblage de nouveaux médicaments. C'est, en France, la démarche d'I-Stem (*Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques*). Un exemple de succès dans ce domaine est celui de la dystrophie myotonique de type 1 ou Maladie de Steinert : l'utilisation de ESC humaines porteuses de la mutation à l'origine de la dérégulation de l'épissage des ARN² observée dans cette maladie a montré que la metformine, un médicament utilisé couramment dans le traitement du diabète, corrigeait cette dérégulation. La metformine est efficace aux doses déjà utilisées pour traiter le diabète. L'intérêt supplémentaire de ce médicament est qu'il est actif de façon générale dans la correction des épissages

2 Épissage : processus par lequel les ARN transcrits à partir de l'ADN génomique subissent des coupures et ligatures qui conduisent à l'élimination de certaines régions dans l'ARN final.

alternatifs, ce qui permet d'espérer une utilisation plus large touchant toutes les maladies relevant de ce phénomène [11]. Il s'agit là d'un bel exemple de repositionnement, c'est-à-dire de la découverte de nouvelles propriétés d'un médicament déjà connu. Ce type de découverte permet de diminuer de façon considérable le coût du développement avant la mise sur le marché pour une nouvelle indication puisque les études de toxicité chez l'animal et l'homme ont déjà été effectuées. En plus de ces études *in vitro*, des cellules différenciées à partir de ESC ont été utilisées dans quelques essais de thérapie régénératrice chez l'homme. Elles possèdent, en effet, dans cette dernière indication, des caractéristiques favorables dont une immunogénicité faible malgré leur nature allogénique, l'inutilité de les reprogrammer avant leur différenciation et le fait qu'elles sont administrées une seule fois au patient (*one shot*) à partir d'une banque de cellules différenciées. L'immunogénicité est variable selon le type de greffe. Les essais visant le cœur incluent souvent une immunosuppression, même si les protocoles sont plus légers que pour les greffes de cellules adultes. Chaque type cellulaire est obtenu grâce à l'apport, dans le milieu de culture, de facteurs de croissance et de différenciation spécifiques, dont la recette est souvent difficile à mettre au point. Des risques potentiels de cancérogenèse associés à ces essais thérapeutiques ont été récemment signalés [12]. En seraient parfois responsables des mutations du gène de la protéine P53, inhibitrice du développement tumoral. Ces risques peuvent être diminués par l'élimination des cellules non différenciées de la préparation administrée au patient et, plus précisément, par l'analyse du génome des cellules avant leur utilisation. À titre d'exemple d'essai thérapeutique chez l'homme, on peut citer l'utilisation de progéniteurs des myocytes cardiaques dérivés de ECS incorporées dans un support de fibrine déposé chirurgicalement sur une zone de myocarde infarcté pour soigner des patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère [13]. Les ESC ont aussi été différenciées en cellules de la rétine pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la maladie de Stargardt [14].

Cellules pluripotentes induites (*Induced pluripotent stem cells* ; iPS)

Un pas décisif a été accompli en 2006 avec la découverte révolutionnaire par Shinya Yamanaka et son équipe, de l'université de Kyoto, qu'il était possible de convertir des cellules somatiques adultes de souris en des cellules présentant toutes les caractéristiques des cellules embryonnaires [15]. Les iPS sont obtenues en transférant, dans le génome de cellules adultes, des vecteurs viraux porteurs des séquences génétiques de quatre facteurs bien définis, OCT4, SOX2, KLF4 et MYC. En les cultivant dans un environnement favorable, ces cellules génétiquement modifiées vont devenir des cellules souches pluripotentes. Une année plus tard, ces mêmes chercheurs rapportèrent la génération d'iPS à partir de fibroblastes humains [16]. Depuis cette date, la technologie des iPS a rapidement évolué. Initialement introduits dans le génome par des rétro- ou des lentivirus qui s'y intègrent, les facteurs de reprogrammation sont maintenant transférés par des méthodes évitant une mutagenèse possible par intégration malencontreuse (utilisation d'adénovirus ne s'intégrant pas dans le génome, introduction de protéines recombinantes ou d'ARNm). L'utilisation des iPS est très prometteuse dans trois domaines, la création de modèles *in vitro* de maladies humaines permettant la découverte de nouveaux médicaments, la fabrication d'organoïdes en trois dimensions et la thérapie régénératrice. Du fait de leur production illimitée et de l'absence du questionnement éthique que pose l'utilisation des cellules embryonnaires, elles sont pratiquement les seules à pouvoir être utilisées comme matériel de base dans l'industrie. Le problème de l'incompatibilité immunitaire peut être résolu par la sélection des donneurs en choisissant ceux porteurs du ou des deux à trois groupes HLA les plus répandus. Reste le risque, encore mal évalué, d'une instabilité génétique créée par la reprogrammation qui est un processus artificiel. C'est la principale interrogation actuelle de l'utilisation des iPS. Mais, l'avenir peut soulever de nouveaux problèmes éthiques. S'il devient possible à partir d'iPS de recréer un embryon complet, devra-t-on considérer cet embryon

artificiel à l'égal d'un embryon humain obtenu par fécondation ? En outre, cet embryon artificiel sera le clone de l'individu dont on aura reprogrammé les cellules, ce que la déclaration des Nations unies de mars 2005 adoptée par la France interdit formellement.

La modélisation des maladies humaines et la recherche de nouveaux médicaments

L'identification des mécanismes altérant les voies métaboliques cellulaires à l'origine des maladies humaines est le préalable indispensable à l'introduction de nouvelles thérapeutiques. Toutefois, l'impossibilité d'accéder facilement à de nombreux types cellulaires, tels les neurones cérébraux ou les cellules du myocarde, limite sérieusement cette possibilité. L'utilisation des iPS obtenues à partir de cellules facilement accessibles comme celles de la peau et du sang surmonte cette difficulté en offrant une source de cellules capables à la fois de s'auto-renouveler et de se différencier. Cette utilisation ouvre deux voies nouvelles, la médecine personnalisée puisque les cellules d'un malade donné peuvent être utilisées, et l'obtention de modèles *in vitro* des maladies génétiques. De plus, elle évite la question éthique de l'emploi des ESC puisque les iPS sont douées des mêmes caractéristiques, dont la pluripotence, leur permettant d'être transformées en tous les types cellulaires provenant des trois feuilletts embryonnaires. Même la mémoire épigénétique paraît subsister dans les iPS [17], ce qui est un avantage par rapport aux ESC qui, évidemment, ne la possèdent pas. Reste la question de savoir si la modélisation *in vitro* permet d'obtenir des modifications phénotypiques strictement semblables à celles observées *in vivo* chez le patient. L'étude des maladies génétiques est passée par deux étapes. La comparaison des iPS provenant du malade avec celles provenant d'un sujet sain est souvent remplacée par l'introduction de la mutation dans des cellules provenant d'un sujet indemne afin d'avoir un témoin parfait sans les polymorphismes inévitables observés chez un sujet différent. La création de ces mutations est maintenant facilitée par les nouvelles techniques d'adressage d'endonucléases à des endroits précis du génome comme

CRISPR-Cas9 avec, cependant, l'inconvénient de la survenue de modifications non voulues (*off target*) du génome qui sont rares, mais toujours possibles. Les iPS mutées et témoins sont ensuite différenciées par incubation dans des milieux de culture appropriés en cellules spécialisées. Après caractérisation des modifications du phénotype à l'origine de la maladie, les cibles moléculaires de nouveaux traitements peuvent être identifiées. Un exemple est celui de la *progeria* de Hutchinson-Gilford caractérisée par un vieillissement accéléré dû à une mutation du gène de la lamine A à l'origine d'une protéine, la progérine, responsable de la maladie, dont la toxicité dépend d'un processus de farnésylation. Les chercheurs de l'I-Stem ont développé un processus de détection des médicaments inhibant la farnésylation. Pour cela, ils ont utilisé des iPS provenant de malades atteints de *progeria* et testé plus de 20 000 molécules. Ils ont pu ainsi identifier des composés de la famille des monoaminopyridines, dont certains déjà utilisés en thérapeutique, qui ciblent des enzymes clés de la farnésylation et, en les inhibant, restaurent un phénotype normal, ce qui ouvre la voie à de nouveaux traitements d'une maladie handicapante conduisant à un décès précoce, avec des médicaments « repositionnés », donc moins coûteux à développer [18]. Les iPS ont été également utilisées pour l'étude des maladies sporadiques, c'est-à-dire sans origine génétique identifiée. En fait, ce type d'étude est difficile parce que ces maladies sont favorisées par de multiples variants génétiques agissant en combinaison avec des facteurs environnementaux. De plus, un problème non résolu est de générer des lignées de cellules témoins ne différant de celles étudiées que par l'absence du variant porteur du risque. L'étude *in vitro* des iPS différenciées à partir de cellules de sujets sains constituent aussi un moyen moins coûteux que celle *in vivo* d'étude de la toxicité d'un médicament. Par exemple, des iPS reprogrammées en myocytes cardiaques ont été utilisées pour évaluer le risque d'arythmie induit par une nouvelle molécule. Il est en effet possible d'étudier *in vitro* les effets de cette molécule sur les canaux ioniques et d'enregistrer les potentiels [19]. Les iPS reprogrammées constituent pour l'industrie une source inépuisable pour ce type d'étude.

Les organoïdes à trois dimensions

Les interactions entre différents types cellulaires sont mieux modélisées en fabriquant des organoïdes à trois dimensions [20]. Cela a été fait pour la plupart des organes en utilisant des ESC ou des iPS humaines différenciées dans les différents types cellulaires d'un organe donné. En effet, l'organisation spatiale dans ces mini-organes témoigne d'une propriété intrinsèque importante des cellules pluripotentes, qui est la propriété d'organogenèse, c'est-à-dire d'établir une organisation spatiale ordonnée, qui rappelle le développement embryonnaire. Cela a été réalisé pour la rétine avec les ESC [21] et pour le rein avec des iPS [22]. Ce dernier travail est exemplaire puisque ses auteurs ont reconstitué des néphrons quasi-complets incluant le glomérule, les tubes proximal et distal, et une ébauche d'anse de Henle. Les profils transcriptionnels sont comparables à ceux obtenus à partir de rein d'embryon au premier trimestre de la gestation. Il est cependant difficile de réaliser une copie parfaite de l'organe d'intérêt, ne serait-ce que par l'absence des cellules inflammatoires et des cellules des vaisseaux. Des organoïdes autologues peuvent être réalisés à partir de tissu recueilli par biopsie. Construire des organoïdes est une approche fascinante de modélisation *in vitro* pour comprendre les interactions cellulaires, les dysfonctionnements pathologiques, et tester de nouvelles approches thérapeutiques. Une utilisation en vue de greffe semble beaucoup plus éloignée du fait de l'absence de vascularisation de ces organoïdes *in vivo*.

Les applications cliniques des iPS en médecine régénératrice

Les iPS peuvent être utilisées à titre autologue ou allogénique. Dans le premier cas, on évite toute réaction immunitaire, ce qui rend inutile le traitement par les immunosuppresseurs. Les inconvénients potentiels sont d'une part la possibilité d'altérations génétiques en rapport avec l'étape de reprogrammation et une longue période de culture incluant un risque de mutations générant des tumeurs. De plus, la technique est coûteuse puisque les cellules sont produites pour un seul patient. L'indication principale reste les maladies génétiques pour lesquelles elles représentent une alternative à la thérapie génique. La

méthode générale d'utilisation dans ce cas suit plusieurs étapes : des cellules somatiques sont reprogrammées en iPS ; leur génome est ensuite modifié par correction des mutations facilitée par les nouvelles méthodes d'édition du génome ; les cellules génétiquement corrigées sont différenciées en cellules du tissu à régénérer ; après contrôle de qualité, les cellules sont administrées au patient. Des maladies chroniques non génétiques sont également visées pour lesquelles des cellules différenciées en cellules normales remplacent les cellules lésées. C'est le cas de la dégénérescence maculaire du sujet âgé récemment traitée par des iPS provenant de fibroblastes cutanés des patients différenciés en cellules épithéliales de la rétine [23].

L'utilisation des iPS en médecine régénératrice à titre allogénique présente des avantages et des risques potentiels, certains communs à leur utilisation à titre autologue. Le principal avantage est de disposer d'une source illimitée de cellules productrices, donc d'être à la base d'une production industrielle possible. En outre, leur utilisation potentielle chez de nombreux malades pour des administrations prévues comme uniques doit diminuer considérablement le coût du traitement. La possibilité d'altérations génétiques et le risque de mutations générant des tumeurs liées à la longue période de culture sont les mêmes que dans les traitements utilisant des iPS autologues. En revanche, le caractère allogène entraîne une réponse immunitaire. Pour pallier ces inconvénients, un contrôle de qualité des cellules est indispensable avant leur administration et les sujets dont les cellules, le plus souvent des fibroblastes cutanés, sont à l'origine de la banque doivent être choisis parmi les porteurs des antigènes HLA les plus répandus dans la population. Les essais d'industrialisation de la méthode sont encore rares. Un bon exemple est la fabrication d'hématies, déjà discutée lorsqu'elle se fait à partir de cellules souches hématopoïétiques, mais également possible à partir d'iPS. Cette technique a l'avantage d'être adaptée à une production industrielle continue et de permettre le choix du phénotype, mais l'inconvénient de souffrir d'une faible prolifération des cellules en culture et d'un taux bas d'énucléation des réticulocytes [24]. Un essai de production industrielle est en cours pour les plaquettes [25]. Dans les deux cas hématies

et plaquettes, bien que dépourvues de noyaux, restent des cellules complexes à produire en raison de leurs nombreuses fonctions qui doivent être précisément régulées.

Tout récemment, des progrès importants ont été réalisés dans la différenciation des iPS humaines avec l'utilisation d'un réseau synthétique de contrôle de lignées (*synthetic lineage-control network*) qui programme les facteurs de transcription clés permettant d'orienter la différenciation de ces iPS vers un type somatique donné [26].



Comment passer des études académiques à la production industrielle de cellules souches

Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, on assiste actuellement au développement de technologies en rupture qui ouvrent des possibilités de traitement entièrement nouvelles. Au cours des quinze dernières années les équipes de biologistes français ont beaucoup travaillé dans ce domaine de recherche, mais paraissent avoir quelques difficultés à passer de ce stade à celui des applications et de la mise au point de procédés utilisables au plan médical.

L'augmentation spectaculaire des résultats obtenus dans l'utilisation des cellules souches en thérapie humaine telle que nous venons de la décrire permet de penser que la preuve de concept est désormais acquise et qu'il est dès maintenant raisonnablement possible d'utiliser ces cellules, après purification et culture, pour traiter en nombre des patients atteints de maladies non ou imparfaitement curables à ce jour de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables [27].

Ce changement de paradigme implique toutefois un changement d'échelle considérable des procédés de production des cellules et de leur préparation afin de les rendre identiques à ceux utilisés pour les médicaments disponibles sur le marché. Cela implique en conséquence d'examiner si le cadre réglementaire existant est adapté à ces nouvelles approches. Il convient également de vérifier

si les droits de propriété intellectuelle acquis sont suffisants pour justifier les investissements financiers importants qu'un développement de moyen à long terme de ces procédés rend indispensables.

Le marché, actuel et potentiel

Ces thérapies nouvelles sont classées en Europe sous la désignation générique de « Médicament de thérapie innovante » ou MTI dont le suivi des demandes réglementaires est assuré par l'Agence européenne du médicament et les agences nationales des États membres.

Au cours des dernières années l'efficacité des cellules souches a été testée pour un grand nombre de maladies à l'étape de la phase I des tests cliniques d'évaluation thérapeutique, qui est celle d'appréciation de la toxicité du protocole, habituellement sur une dizaine de patients. Les phases II et III, portant sur les tests d'efficacité et de tolérance étant plus complexes, le nombre de programmes en cours reste limité (environ 2 ou 3 études, essentiellement de phase II, pour chacun d'entre eux avec une trentaine de patients dans chaque étude). Pour chacune des applications retenues il est obligatoire de procéder aux tests précliniques réglementaires portant sur la qualité des cellules à utiliser (homogénéité, stérilité, recherche de mutations, critères de différenciation...). La préparation des cellules est donc essentielle : une fois décrites et approuvées par les autorités réglementaires, les méthodes de fabrication ne doivent faire l'objet d'aucune modification ultérieure.

Les applications du traitement par les cellules souches visent principalement le cancer (leucémies, mélanome...), la régénération tissulaire (infarctus du myocarde, cartilage, peau, système nerveux...) et l'ingénierie d'organe. Actuellement, de nombreux travaux portant sur la « décellularisation » (obtention d'un support de matrice extracellulaire isolée après lyse et évacuation des débris cellulaires) et la « recellularisation » (ensemencement de ces supports par de nouvelles cellules) sont engagés. Ces projets d'ingénierie tissulaire concernent le cœur, le rein, le foie et d'autres organes.

Le marché dans le monde

Une étude récente [29] évalue le marché en 2014 à 4,5 milliards de \$ dans le monde, incluant la thérapie cellulaire proprement dite, la recherche et les services associés ainsi que les banques de sang placentaire. La valeur du marché en 2020 devrait atteindre 12 milliards de dollars US et 31 en 2026. La croissance de ce marché aurait été de 11 % au cours des cinq dernières années. Bien que ne représentant actuellement que moins de 1 % du marché des médicaments, son potentiel est considérable : l'ingénierie cellulaire des reins qui vise à remplacer la dialyse, l'utilisation des cellules souches pour la régénération des os dentaires ou le traitement de l'ischémie des membres inférieurs, complication fréquente du diabète aujourd'hui sans solution, permettraient, par exemple, en cas de validation des études cliniques en cours, de déplacer de nouveaux segments de marché très importants.

Le marché est porté essentiellement par les États-Unis, avec une valeur de 2,3 milliards de US\$ en 2016, face à l'Europe avec 1,5 milliards, où l'Allemagne domine devant ses voisins ayant un niveau de développement à peu près similaire : le Royaume-Unis, la France en 3^e place, l'Italie et l'Espagne où il progresse rapidement. L'Asie représenterait 1,5 milliards et des développements considérables ont lieu, actuellement, en Corée du Sud et au Japon, pays où les contraintes réglementaires sont en cours d'assouplissement. La Chine, qui a commencé très tôt à s'intéresser à ces applications thérapeutiques, a mis en place une réglementation très contraignante qui rend difficile l'homologation de nouveaux produits dans ce domaine. Toutefois, très récemment, de nouveaux essais sur le traitement de la maladie de Parkinson y ont été lancés [30].

Dix produits « cellules souches » sont aujourd'hui sur le marché dont aucun français ainsi qu'une vingtaine de produits d'ingénierie tissulaire (dont deux commercialisés en France mais non remboursés par la Sécurité sociale). Au plan mondial plus de 100 études cliniques seraient en cours et 36 produits en voie de développement, la majorité en phases II/III et III [31]. À noter qu'à ce jour, sur 744 essais cliniques utilisant les MSC recensés dans <https://clinical-trials.gov>, 142 ont été réalisés aux États-Unis, 147 en Europe et 230 en Chine.

- Deux produits sont en cours d'enregistrement européen :
- HSV-TK : lymphocytes T de donneurs génétiquement modifiés, traitement dans le cadre de la transplantation des cellules souches hématopoïétiques ; Société MOLMED (Italie) en cours d'enregistrement depuis 2014 ;
 - Cx-601 : MSC dérivées de tissu adipeux dans le traitement de la fistule anale de Crohn par la société Tigenix (Belgique).

La situation en France

La France dispose de plus de quatre-vingt-dix équipes académiques provenant essentiellement de quatorze CHU et d'autres institutions publiques : Inserm, CEA, CNRS, Institut Pasteur, Établissement français du sang. Une dizaine d'entreprises, essentiellement des *start-ups*, travaillent au développement de nouveaux produits.

Cependant, aucune des grandes entreprises pharmaceutiques nationales ne s'est encore investie directement sur ce créneau. Sanofi, qui avait trouvé en rachetant la firme américaine Genzyme un ensemble de projets dans ce domaine les a revendus depuis. Le Groupe a passé un contrat de recherche commun avec EVOTEC dans le domaine du diabète [32]. Le Groupe Servier a mis en place une veille scientifique active et passé un contrat de recherche avec CELLECTIS sur un sujet proche, mais différent.

Seul le Groupe l'Oréal, présent dans le domaine des soins de la peau, travaille activement dans le domaine des cellules souche dermiques et épidermiques. Impliqués dans ce programme de recherche scientifique depuis une trentaine d'années, ses chercheurs ont développé des applications « cellules souches » à des fins d'évaluation et de mise au point de techniques : les cellules souches ainsi cultivées permettent de tester l'efficacité et la sécurité des nouveaux produits à effet dermatologique du groupe, en culture de cellules plutôt qu'*in vivo* sur les animaux. Fort de ce savoir-faire unique, l'Oréal a créé la société EPISKIN, basée à Lyon. EPISKIN est un leader mondial pour la mise à disposition des industries cosmétiques, pharmaceutiques et chimiques, de quantités importantes de modèles de tissus humains produits *in vitro* dans des conditions

industrielles. EPISKIN produit ainsi chaque semaine des milliers d'échantillons d'épiderme avec ou sans mélanocytes, de derme, d'épithélium de cornée ou de muqueuse reconstitués. Plus récemment, l'Oréal s'est intéressé aussi aux développements de la régénération cutanée à partir de cellules souches pour rajeunir ou réparer la peau, domaine où les *start-ups* coréennes et japonaises sont très actives.

Les équipements nécessaires

La production industrielle s'adresse uniquement aux cellules souches allogéniques, MSC ou iPS. Elle nécessite un matériel adapté qui comprend essentiellement les bioréacteurs, les microsoutports, l'équipement de séparation et de cryopréservation des cellules [28].

Les bioréacteurs suppléent à la plupart des inconvénients de la culture classique en boîtes en 2 D. Ce sont des systèmes dynamiques où les fluides circulent, à l'opposé des cultures en 2 D. De nombreux types de bioréacteurs sont disponibles allant de 250 à 2 000 L et plus. Ils peuvent être utilisés pour cultiver des cellules en suspension, des agrégats de cellules et des cellules adhérant à des micro-soutports. L'avantage majeur des bioréacteurs est leur efficacité en terme du nombre de cellules obtenues à partir d'un volume initial, jusqu'à 80 fois plus petit qu'avec la culture en 2 D. Les avantages supplémentaires par rapport aux enceintes habituelles sont un espace réduit, un processus fermé à l'abri des contaminations, un système automatisé de changement du milieu et un contrôle plus précis de l'environnement (température, pH, composition de l'atmosphère). En outre, les bioréacteurs peuvent avoir des usages multiples tels que la production de protéines, de biosimilaires et de virus. Leurs inconvénients sont leur prix, la nécessité d'un personnel qualifié pour leur mise en place et le suivi, et l'éventuel effet des forces de cisaillement (*shear stress*) produit sur les cellules par la circulation du milieu de culture. La culture en 2 D reste nécessaire aux étapes préliminaires comme la purification des cellules et l'ensemencement. Du fait des différences environnementales pour

les cultures en boîtes et en bioréacteurs, les caractéristiques biologiques des cellules obtenues peuvent être différentes. C'est le cas des MSC dont l'activité est basée sur leurs produits de sécrétion. Il convient donc d'évaluer avec soin les propriétés des cellules obtenues en bioréacteur.

Les microsoutports sont statiques ou mobiles, poreux ou non poreux revêtus d'un support favorisant l'adhérence des cellules.

Les processus finaux de préparation des cellules incluent le recueil des cellules, le lavage, la concentration, la vérification de l'absence de contaminants, la mise en place des cellules dans un excipient approprié et la cryopréservation finale à -196 °C dans l'azote liquide. Tous ces processus doivent se dérouler en un temps limité, les qualités des cellules pouvant être affectées par un maintien prolongé dans un environnement suboptimal.

Les problèmes à surmonter pour passer des études en laboratoire à la production industrielle

Les thérapies basées sur l'utilisation de cellules, en particulier celles utilisant les cellules souches à des fins de médecine régénératrice, peuvent apporter un bénéfice économique en santé publique. Cependant, pour y arriver, elles nécessitent de maîtriser de façon reproductible la production en grand volume de cellules de bonne qualité, à des coûts compatibles avec les besoins du marché. De plus, pour accéder au « médicament » il est impératif de mener ces études dans le cadre des « Bonnes pratiques de fabrication », contrôlées par les autorités de santé [33, 34].

Si les équipes de recherche française sont de bon niveau par rapport à la compétition internationale, on constate cependant en aval des lacunes pour passer de la phase *recherche* au *développement industriel* : On peut citer :

- une absence d'expertise pharmaceutique dans les équipes de recherche permettant dès les phases cliniques en amont, de développer des procédés industriels respectant le nouveau cadre réglementaire européen *Advanced Therapy Medicinal Product* (ATMP) ;

- des capacités de production obéissant aux règles de Bonnes pratiques de fabrication (BPF) insuffisantes pour obtenir des lots utilisables dans les essais cliniques, notamment en phase III ;
- un manque d'opérateurs pharmaceutiques pouvant assurer la commercialisation et la distribution.

Pour arriver à produire ces cellules à l'échelle industrielle, il est nécessaire d'investir dans des technologies et des techniques qui permettront

- (i) d'augmenter de façon sensible la production,
- (ii) d'améliorer sa reproductibilité en maintenant la qualité des cellules mesurée par leur efficacité biologique,
- (iii) de réduire les coûts de production industrielle et le coût des produits commerciaux. Enfin, l'efficacité des traitements et leur innocuité pour le patient doivent être absolument garanties.

La thérapie cellulaire est basée sur l'utilisation de cellules vivantes isolées et provenant soit d'un donneur (allogéniques), soit du patient à traiter (autologues), à des fins thérapeutiques. Différents types de cellules et modes d'action sont utilisés en thérapie cellulaire, depuis les MSC allogéniques qui sont injectées par voie intraveineuse ou intramusculaire pour traiter l'infarctus ou les artérites, jusqu'aux cellules immunitaires autologues modifiées génétiquement et injectées par voie intraveineuse pour éliminer le cancer par immunothérapie, en passant par les iPS d'origine autologue qui sont différenciées en cellules capables de produire de l'insuline, encapsulées et injectées sous la peau pour traiter le diabète.

Bien que l'ensemble de ces technologies ouvre de grands espoirs en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire, la préparation de ces cellules à l'échelle industrielle pose des problèmes considérables. Le Groupe de travail a auditionné plusieurs acteurs du domaine sur ce thème et a recensé de nombreuses publications sur le sujet [35,36, 37]. Il lui semble que ces contraintes technologiques peuvent se résumer à trois types de problématiques :

- quels milieux faut-il adopter ?

- quel processus global depuis l'ensemencement jusqu'à la récupération des cellules ?
- combien de cellules faut-il produire ? (selon les traitements à mettre en œuvre de 10^6 à 10^{15} ?).

Ces nouveaux produits thérapeutiques ne sont pas seulement complexes à fabriquer, mais les préparations cellulaires qui en sont la base sont souvent sensibles à des modifications ou des variations mineures des procédés de culture, pouvant résulter en une inefficacité du traitement. S'il est indispensable de comprendre les mécanismes de biologie cellulaire impliqués, la maîtrise du mode d'action clinique, du procédé et des conditions de fabrication sont, chacune, indispensables au succès de l'ensemble. Cela implique une quantité considérable de R&D de ces procédés après la mise en évidence au laboratoire de la preuve de concept.

Ces difficultés, au-delà du traitement réglementaire des différentes étapes sur lequel nous revenons plus loin, sont à considérer avec beaucoup d'attention. En effet la pratique et le savoir-faire du laboratoire de biologie cellulaire classique se révéleront rapidement insuffisants pour la production à moyenne puis grande échelle des cellules « médicaments ». Au-delà des procédés proprement dits, le cadre réglementaire des bonnes pratiques de fabrication implique :

- (i) de standardiser les matières premières utilisées qui doivent, elles aussi, être de qualité reproductible sur la durée et avalisées par les autorités sanitaires ;
- (ii) de permettre la production de lots suffisamment importants pour respecter l'ensemble des caractéristiques cliniques exigées par le régulateur. Quelques laboratoires français ont anticipé ce problème en investissant dans des outils de production de taille plus importante (CELL for CURE, filiale du LFB ; Percy, Hôpital et Centre de recherche militaire) et / ou en développant des systèmes automatisés (I-stem, Évry) permettant de produire dans des conditions standardisées les cellules dans leur meilleur état d'activité, au moins en quantités suffisantes pour effectuer les tests

de phase I du développement du médicament. Chaque système cellulaire étant spécifique, il convient par conséquent de mettre au point, pour chaque application les éléments de procédés adéquats et ce, qui plus est dans un cadre réglementaire nécessairement très contraignant.

Un progrès en cours : les plates-formes

Ce type de développement est courant en biotechnologie « blanche » pour la culture en grand volume des microorganismes, ou en biotechnologie « rouge » pour la culture de cellules somatiques comme les hybridomes, dans les meilleures conditions de rendement par rapport aux matières premières mises en jeu et de productivité. Il nécessite toutefois une approche d'ingénierie spécifique et la présence sur le terrain d'ingénieurs formés à ce type de technologies. Cette formation n'est pas, à notre connaissance, dispensée en France, ni dans les universités, ni dans les écoles d'ingénieurs (À l'exception du Laboratoire des réactions et génie des procédés de l'université de Lorraine à Nancy).

Confrontés à ce type de problèmes, certains pays ont développé des approches partenariales entre les différents acteurs impliqués en montant des plates-formes public-privé.

Royal Free London National Health Service Foundation Institute

Institution du Royaume-Uni, c'est une plate-forme technologique donnant accès à la réalisation de tous les services liés aux thérapies géniques et cellulaires. Montée dans un cadre public-privé en partenariat avec des grandes sociétés pharmaceutiques et des sociétés de biotechnologies, elle a consenti des investissements importants pour être autosuffisante pour la production des cellules et réaliser les essais cliniques. La plate-forme prend en charge la production des cellules pour des thérapies de routine et des phases de tests précliniques, en apportant des financements aux projets de recherche via des sources publiques et privées. Les contrats de prestations de services assurés par la plate-forme vont jusqu'à proposer de prendre en charge la négociation

sur les droits de propriété intellectuelle. Les projets, une fois réalisés et validés réglementairement sont transférés à l'industrie pharmaceutique sous forme de licence pour la commercialisation des MTI.

Le projet Vectura

Mis en place en Suède, c'est un autre modèle. Il s'agit d'une structure publique qui finance les activités de recherche clinique et qui vend les résultats des phases I et II aux industriels. Vectura regroupe une structure de financement des programmes académiques de recherche et de développement préclinique des acteurs amont de la recherche et une plate-forme centrale fonctionnant comme un centre de mise en œuvre (CMO) qui fournit des contrats de prestations de service pour les phases I et II gérés par une unité hospitalière pour l'ensemble des services hospitaliers. Cette structure transfère ensuite les projets aux industries pharmaceutiques pour la phase III des tests cliniques et la commercialisation des MTI.

CELL for CURE

La France via le groupe LFB, société d'État, a mis en place une structure du même ordre, en 2010. CELL for CURE bénéficie du statut d'établissement pharmaceutique indispensable dans le cadre de la réglementation française et se positionne elle aussi comme un CMO capable de produire les cellules selon les conditions réglementaires GMP (*Good Manufacturing Practices*). La société propose aussi un ensemble de services allant de la paillasse au patient et au marché, incluant l'optimisation et l'industrialisation des procédés, la préparation de lots cliniques ou commerciaux de cellules, les services associés aux dossiers cliniques réglementaires et, éventuellement, la distribution des médicaments produits.

AFM-Téléthon

Enfin, en novembre 2016, cette association caritative, a créé en partenariat avec la Banque publique d'investissement (BPI) sa filiale YpoSkési, plate-forme

de production de cellules pour la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Cette plate-forme sera également accessible aux laboratoires de recherche et aux *start-ups* pour développer dans les conditions optimales leurs procédés.

On peut donc considérer que les moyens sont actuellement disponibles ou le seront rapidement pour répondre aux exigences réglementaires envisagées plus loin.

Propriété intellectuelle

Les questions liées à la propriété intellectuelle sont essentielles dans le développement industriel des technologies [38]. La possession d'un brevet, d'abord de portée nationale et ensuite étendu aux régions du monde qui travaillent dans le domaine, constitue une étape indispensable pour assurer au propriétaire des résultats une antériorité qui puisse être défendue devant les tribunaux en cas de contrefaçon. Cette propriété intellectuelle est de fait exigée par les investisseurs avant qu'ils acceptent d'apporter leurs contributions financières à un projet technologique. À cet égard, la nature même des cellules souches et des conditions de leur utilisation pose des questions particulières. En effet, en tant que matériel humain biologique, ces cellules ne sont pas brevetables comme telles, pas plus que les procédés thérapeutiques mis en œuvre. Seules les techniques qui permettent de les produire à grande échelle le sont, ainsi que les systèmes et appareils à usages médicaux qui permettent de les manipuler en conditions stériles [39]. Les protocoles qui permettent leur culture et, éventuellement, leur différenciation *in vitro* sont *a priori* également brevetables, mais, en pratique, doivent préférablement être considérées comme un savoir-faire secret. En effet, il est très difficile de connaître la composition des milieux utilisés par un concurrent éventuel et, par conséquent, d'apporter la preuve qu'il a indûment copié une recette brevetée. Ces questions se retrouvent évidemment dans les sujets de discussion avec les organismes réglementaires et les conditions d'un compromis entre les deux parties doivent être trouvées très tôt dans la démarche.

Les questions éthiques

Le règlement sur les MTI observe les principes inscrits dans la Charte des droits fondamentaux de l'Union européenne. La réglementation des MTI au niveau communautaire ne porte pas atteinte aux décisions prises par les États-membres concernant l'opportunité d'autoriser l'utilisation de tel ou tel type de cellules humaines (par exemple les cellules souches embryonnaires, ou les cellules animales). Ainsi, un MTI bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) centralisée qui s'impose à tous les États-membres) pourrait, sur des critères éthiques nationaux, être interdit de commercialisation ou se voir appliquer des conditions spécifiques vis-à-vis de sa distribution ou de son utilisation. Il est, de ce fait, recommandé en France, de prendre en considération l'ensemble des éléments inclus dans les lois de bioéthique de 2011 et 2013.

En mai 2016, l'*International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) », organisation groupant de nombreux experts de tous les pays dans le domaine des cellules souches, a actualisé son guide définissant les règles devant régir les recherches et les essais thérapeutiques utilisant les cellules souches (40). Plusieurs de ces directives portent sur le passage à l'étape industrielle :

- 1- renforcer les études précliniques afin de vérifier la reproductibilité des résultats et afin de pouvoir définir des normes strictes devant guider l'essai thérapeutique ;
- 2- choisir des preuves indiscutables d'efficacité de l'essai thérapeutique et s'assurer de l'innocuité du traitement ;
- 3- souligner la responsabilité des scientifiques, des cliniciens et des media dans la présentation de rapports précis et équilibrés des progrès obtenus incluant les échecs et les complications observées ;
- 4- exiger la déclaration de tous les essais thérapeutiques réussis ou non dans des registres nationaux consultables par tous, ce qui est déjà le cas aux États-Unis avec le *Clinical trials government registry* (www.clinicaltrials.gov).

Les contraintes réglementaires relatives aux médicaments de thérapie cellulaire en France

Les essais cités plus haut étaient menés dans les hôpitaux universitaires en coopération avec des laboratoires de recherche académique. Cela n'est plus possible et, seuls, les établissements pharmaceutiques privés ou publics / associatifs autorisés par l'Agence nationale de sécurité des médicaments (ANSM) sont autorisés à fabriquer et délivrer des MTI et des MTI-PP (MTI fabriqués de façon ponctuelle pour un malade donné) en application des articles L.5124-1 et L.5124-9-1 du Code de santé publique. Ces sociétés devront se plier avant juin 2018 à de nouvelles normes identiques à celles observées par l'industrie pharmaceutique pour la préparation des médicaments.

Les différents types de produit

Avec l'entrée en vigueur du règlement européen, trois grands types de produits existent aujourd'hui, chacun relevant d'un cadre réglementaire spécifique.

Les médicaments de thérapie innovante

Leur définition couvre les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant MTI à un dispositif médical). Ce statut regroupe les produits ayant subi une

manipulation substantielle (par exemple, une culture cellulaire, une étape d'activation ou de différenciation cellulaire) ou correspondant à un usage des cellules indépendant de leur origine (par exemple, injection de cellules souches médullaires dans le cœur). Le développement de ces produits suit le règlement européen n° 1394/2007 [41]. L'autorisation des essais cliniques dépend des instances administratives nationales alors que l'autorisation de mise sur le marché et l'ensemble des procédures de suivi post-autorisation dépendent des instances européennes.

Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP)

Ce sont des MTI fabriqués et utilisés au sein d'un unique État membre. Ces MTI-PP suivent le régime des MTI du règlement européen, mais sont cependant exemptés de la clause de l'AMM centralisée. Ils doivent obéir à la réglementation nationale en matière de qualité et de sécurité qui est identique à celle de l'Union européenne. Ce nouveau type de produits, créé par le règlement européen, a été introduit dans le Code de la santé publique français par la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011 [43]. Cette catégorie de médicament est définie dans le règlement n° 1394/2007 par la terminologie « exemption hospitalière » [41].

Les médicaments de thérapie innovante expérimentaux

Ce sont des MTI préparés en vue d'essais cliniques dans des établissements possédant une banque de cellules et tissus par autorisation de l'ANSM [42]

Les préparations

Ce sont des produits cellulaires ou tissulaires (allogéniques ou autologues) à finalité thérapeutique. Ces produits de santé relèvent de la compétence de l'ANSM et sont réglementés au plan national sur la base de la directive 2004/23/CE [44].

Les principaux textes réglementaires

Les règlements européens

Les directives n° 2001/83 /CE et 2004/23/CE fixent les 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 humains [44, 45]]. Le règlement européen n° 1394/2007/CE ne déroge pas aux principes fondamentaux énoncés dans ces directives. Il confirme le statut de médicament (spécialité pharmaceutique) des MTI et introduit des exigences nouvelles [40]. Entré en vigueur le 30 décembre 2008, avec une période transitoire pour les produits déjà sur le marché, ce règlement sur les MTI a considérablement modifié les règlements applicables aux traitements incluant dans leurs mécanismes d'action des gènes, tissus ou cellules. En confirmant le statut de médicament des produits de thérapie génique, cellulaire et d'ingénierie tissulaire ainsi que des médicaments combinés de thérapie innovante, il introduit des dispositions spécifiques qui complètent les dispositions générales, énoncées dans la directive 2001/83/CE [45] instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Avant l'entrée en vigueur de ce règlement, l'absence d'un cadre réglementaire commun aux États membres de l'Union européenne pouvait limiter le développement de ces produits, faute de perspective de marché claire et harmonisée et, au final, limiter l'accès des patients à de nouvelles approches prometteuses pour des maladies graves actuellement sans solution thérapeutique.

L'objectif du règlement n°1394/2007 est donc, pour l'essentiel, l'harmonisation des procédures d'accès au marché dans l'ensemble des États membres de l'Union européenne via la centralisation de l'autorisation préalable. Pour cela, il établit un référentiel adapté applicable dans l'ensemble de l'Union et introduit des obligations de suivi de la sécurité et de l'efficacité, une fois le produit mis sur le marché. Il met également en place un Comité des thérapies innovantes, le *Committee for Advanced Therapies* (CAT) dépendant de l'Agence européenne du médicament (*European Medicines Agency ; EMA*).

La loi française

Les changements réglementaires d'origine européenne ont ajouté à la complexité de la législation nationale. L'homologation de bonnes pratiques pour l'utilisation des cellules souches en décembre 1998 par les autorités françaises avait ouvert la voie à des développements importants à condition que l'ensemble des travaux soient réalisés au sein des hôpitaux, seuls à même de disposer des banques de sang indispensables à la purification et à la culture des cellules souches. Une dizaine d'établissements s'étaient ainsi équipés pour fournir aux praticiens hospitaliers les cellules cultivées à petite échelle nécessaires aux expériences de preuve de concept. Des restrictions supplémentaires (décrets 2012/136 et 2016/1536) ont été imposées au secteur hospitalier français dans la mise en conformité aux normes du règlement européen n° 1394/2007 en freinant davantage le développement des activités de production dans les hôpitaux français, contrairement à ce qui s'est passé en Allemagne ou en Grande-Bretagne [46, 47]. La loi n°2011-302 introduit dans le Code de santé publique ce nouveau type de produit, le MTI. Le décret du 15 novembre 2016 [47] concerne tous les établissements dévolus à la préparation de médicaments de thérapie innovante (industries du secteur pharmaceutique, établissements de santé ou établissements de transfusion sanguine). Il porte sur la procédure et les conditions d'autorisation des établissements préparant des MTI. Il achève l'adaptation en droit français du règlement Européen de 2007 [41]. Il donne la possibilité d'importer et d'exporter des MTI-PP dans le cadre des recherches biomédicales et autorise les établissements de santé à conduire des études portant sur les MTI relevant du règlement européen. De plus, la décision du 5 mai 2017 de l'ANSM modifiant la décision du 27 octobre 2010 définit les règles des bonnes pratiques applicables [48]. Il faut enfin citer les lois relatives à la bioéthique (loi du 6 août 2013 amendant la loi n°2011-814) qui stipule les conditions d'utilisation des cellules embryonnaires humaines [49].

Il ressort des auditions menées par le Groupe de travail que seuls un petit nombre de laboratoires hospitaliers ont la capacité financière d'effectuer les changements normatifs requis. On estime à trois ou quatre seulement ceux qui

pourront effectivement continuer de travailler avec les cellules souches d'ici à 2018, date de mise en œuvre définitive du nouveau contexte réglementaire en France. Il conviendrait de préserver la possibilité, pour les établissements autorisés à préparer des MTI-PP et des MTI expérimentaux, d'entreprendre des essais cliniques en phase I/II en accord avec l'industrie pharmaceutique.

Au-delà, le groupe de travail a également noté que l'application de ces derniers règlements constitue un blocage pour le développement industriel des MTI dès lors que les cellules souches proviennent du sang humain et que les industriels n'y ont pas accès compte tenu du monopole détenu par l'Établissement français du sang, opérateur unique de la transfusion sanguine pour les prélèvements du sang et leur distribution aux établissements de santé.

Il a noté également que les entreprises se plaignaient d'un manque de réactivité de la part des autorités réglementaires, à la fois pour les conseiller dans les démarches à accomplir que pour répondre aux documents fournis. Ce manque de réactivité est manifeste lorsqu'on apprécie le délai de leurs réponses par rapport à celui prévu par les textes réglementaires.

Les étapes successives de la naissance d'un MTI

Ces étapes sont au nombre de quatre : la fabrication, les essais thérapeutiques, l'autorisation de mise sur le marché et le remboursement.

La fabrication

Les MTI répondent à la définition de médicament, au sens de la directive princeps 2001/83 [45], et doivent être fabriqués selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF) applicables aux médicaments à usage humain par un établissement pharmaceutique (EP). Les établissements de santé abritant des unités de thérapie cellulaire constituent une communauté riche en compétences et expériences nécessaires au futur développement des MTI. Ils ont développé des interactions fortes avec les scientifiques impliqués dans les étapes de conception et de validations pré-cliniques et les cliniciens convaincus

de l'intérêt de ces produits pour leurs patients. La conjonction du règlement européen sur les MTI publié en 2007 [41], et des exigences réglementaires spécifiquement françaises du Code de la santé publique portant sur la notion d'établissement pharmaceutique, constitue actuellement un obstacle pour les Unités de thérapie cellulaire opérant sous tutelle d'un établissement de soins, et souhaitant préparer des MTI. Elles doivent pour cela créer un groupement d'intérêt économique (GIE) ou une société anonyme (SA). Le décret du 15 novembre 2016 [47] concerne tous les établissements dévolus à la préparation de médicaments de thérapie innovante (industriels du secteur pharmaceutique, établissements de santé ou établissements de transfusion sanguine). Il porte sur la procédure et les conditions d'autorisation des établissements préparant des MTI. Il achève l'adaptation en droit français du règlement Européen de 2007 [41].

Les essais cliniques

Les protocoles d'essais cliniques font l'objet d'une double autorisation, celle du Comité de protection des personnes (CPP) et celle de l'ANSM agissant indépendamment l'un de l'autre. Le CPP vérifie que les règles éthiques en vigueur dans les essais thérapeutiques de toute nature sont respectées, la principale étant le consentement éclairé des patients. L'ANSM prend l'avis de l'Agence nationale de la biomédecine (ABM) et, si le produit étudié a été génétiquement modifié, du Haut conseil des biotechnologies. Ces différentes instances vérifient la recevabilité administrative et technique de la demande et procède à une évaluation interne ou faisant appel à des experts extérieurs à l'Agence.

L'autorisation de mise sur le marché

Il s'agit là d'un processus européen dépendant de l'EMA. Celle-ci prend l'avis du Comité des thérapeutiques innovantes (*Committee for advanced therapies*) qui s'assure de la qualité, la sûreté, l'efficacité et l'originalité du produit en tenant compte des acquis scientifiques dans le domaine. Ce processus demande des délais de 1 à 2 ans avant la réponse définitive.

Le remboursement au patient

En France, l'accès au remboursement passe par la commission de transparence de la Haute autorité de santé (délai de réponse de 90 à 180 jours). Le remboursement est jugé selon le service médical rendu. Trois instances sont concernées et donnent leurs avis : l'Union nationale des Caisses d'assurance maladie (UNCAM), le ministère de la santé et le Comité économique des produits de santé (CEPS). Une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) peut être donnée. Le taux de remboursement est fixé par l'UNCAM et peut varier de 0 à 65 % (cinq niveaux d'appréciation du service médical rendu). Les données à fournir sont les données précliniques et cliniques (avis de l'ANSM), celles issues de l'autorisation temporaire d'utilisation, celles relatives à la tolérance et celles résultant de nouvelles études cliniques disponibles. De nouvelles missions devraient être données à la Haute autorité de santé (HAS) et à l'UNCAM. Les arrêtés devant les fixer sont en attente. L'HAS préconise un contact avec ses services dès la fin de la phase II des essais cliniques afin de préciser la qualité des données et les modalités thérapeutiques dans l'optique de l'obtention de l'AMM.



Recommandations

L'analyse des questions soulevées par l'industrialisation de la production des cellules souches amène les deux académies à formuler les recommandations suivantes que nous grouperons en deux domaines distincts :

A- Environnement réglementaire pour les MTI cellules souches

Étendre à des domaines d'application précliniques et cliniques les études préliminaires à l'utilisation des cellules embryonnaires humaines pour la production de MTI que la Loi de bioéthique limite en fait à la recherche fondamentale ;

Permettre à l'Établissement français du sang et aux banques de sang de cordon de fournir aux industriels les cellules nécessaires à la fabrication d'un MTI ;

Alléger les contraintes réglementaires relatives à la protection des données personnelles tout en préservant la traçabilité des cellules utilisées ;

Faciliter l'importation et l'exportation des cellules et des matières premières biologiques nécessaires à la production de MTI en respectant les règles de traçabilité ;

Rendre possible la délivrance par l'ANSM de l'autorisation de fabriquer des matières premières à usage pharmaceutique entrant dans la fabrication des MTI ;

Aider les établissements autorisés à préparer des MTI-PP et des MTI expérimentaux à entreprendre des essais cliniques en phase I/II en accord avec l'industrie pharmaceutique ;

Ouvrir aux MTI la réglementation des ATU permettant ainsi la mise sur le marché pour une période de temps limitée et contrôlée de ces produits très innovants dès la fin de la phase III des essais cliniques ;

Demander à la HAS d'accélérer l'examen des dossiers et d'améliorer les conditions de remboursements des MTI ayant fait la preuve de leur efficacité ;

Rendre obligatoire la publication sur un site dédié de tous les résultats d'essais thérapeutiques et des incidents éventuels survenus, y compris les essais qui n'ont pas abouti à des résultats positifs ;

B-Aide à la création de *start-ups* pour la production industrielle de cellules souches

Favoriser le développement des plates-formes déjà en place et la création de nouvelles plates-formes pour apporter l'aide nécessaire en matière d'industrialisation des procédés de fabrication, de préparation de lots satisfaisant aux conditions de mise sur le marché et de conseils pour présenter les dossiers nécessaires à leur obtention aux petites structures de production de cellules souches à visée thérapeutique ;

Renforcer la formation aux technologies correspondantes dans le cadre universitaire ou d'Écoles d'ingénieurs ;

Demander aux industriels de lancer des appels d'offres auprès des laboratoires académiques ciblant les axes des travaux qu'ils privilégient afin de développer des collaborations.

Créer les conditions financières en France permettant aux sociétés d'aller jusqu'aux phases III des études cliniques pour permettre l'émergence de nouveaux groupes pharmaceutiques spécialisés dans cet axe de la médecine régénératrice.



Références

- 1- Le Gall JY, Ardaillou R. Cellules souches et perspectives thérapeutiques. Bull. Acad. Natle Méd. 2010; 194: 1601-1620.
- 2- Mathé G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Larrieu MJ, Kalic D, Djukic Z. Transfusions et greffe de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés à haute dose accidentellement. Rev Fr Etud Clin Biol. 1959; 4: 226-238.
- 3- Mathé G, Amiel, JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation. Br Med J. 1963; 2: 1633–1635.
- 4- Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D., Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. New Engl. J. Med. 1989; 321 : 1174-1178.
- 5- Bourel M, Ardaillou R. Les banques de sang de cordon autologue. Bull. Acad. Natle Med., 2002; 186: 1543-1550.
- 6- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomä C, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Malhaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Audat F, Blanche S, Audit M, l'Homme B, Bougnères P, Fischer A, Von Kalle C, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy With Lentiviral Vector in X adrenoleukodystrophy Science, 2009 ; 326 ::818-823.
- 7- Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, François S, Trugnan G, Peyrard T, Marie T, Jolly S, Hebert N, Mazurier C, Mario N,

- Harmand L, Lapillonne H, Devaux JY, Douay L. Proof of principle for trans- fusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood*. 2011; 118: 5071-5079.
- 8- Siepe M, Heilmann C, von Samson P, Menasché P, Beyersdorf F. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005; 28:318-324
- 9- Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, et al. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med*. 2007; 2: 785-794.
- 10- Sun TJ, Tao R, Han YQ, Xu G, Liu J, Han YF. Therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells with Wnt/ β -catenin signaling pathway pre- activated for the treatment of diabetic wounds. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18: 2460-2464.
- 11- Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, Boland A, Battail C, Artiguenave F, Deleuze JF, Bénit P, Rustin P, Franc S, Charpentier G, Furling D, Bassez GNissan X, Martinat C, Peschanski M, Baghdoyan S. In Vitro and In Vivo modulation of alternative splicing by the biguanide met- formin. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015; 4: 262. doi: 10.1038/mtna.2015.35.
- 12- Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, Kashin S, Mekhoubad S, Ilic D, Charlton M, Saphier G, Handsaker RE, Genovese G, Bar S, Benvenisty N, McCarroll SA, Eggan K. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*. 2017 May 11; 545(7653):229-233. doi: 10.1038/nature22312. Epub 2017 Apr 26
- 13- Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, Parou- chev A, Benhamouda N, Tachdjian G, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Guillemain R, Suberbielle Boissel C, Tartour E, Desnos M, Larghero J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J*. 2015; 36: 2011-2017.
- 14- Schwartz SD, Tan G, Hosseini H, Nagiel A. Subretinal Transplantation of embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium for the treatment

- of macular degeneration: An assessment at 4 years. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Apr 1; 57(5):ORSFc1-9. doi: 10.1167/iovs.15-18681.
- 15- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 ; 126 : 663-676.
- 16- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from human adult fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-872.
- 17- Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 541-549.
- 18- Blondel S, Egesipe AL, Picardi P, Jaskowiak AL, Notarnicola M, Ragot J, Tournois J, Le Corf A, Brinon B, Poydenot P, Georges P, Navarro C, Pitrez PR, Ferreira L, Bollot G, Bauvais C, Laustriat D, Mejat A, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, Bifulco M, Peschanski M, Nissan X. Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. *Cell Death Dis*. 2016 ; Feb 18;7:e2105. doi: 10.1038/cddis.2015.374.
- 19- Qu Y, Vargas HM. Proarrhythmia risk assessment in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes using the Maestro MEA platform. *Toxicol.Sci*. 2015; 147: 286-295.
- 20- Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol*. 2016; 18: 246-254.
- 21- Völkner M, Zschätzsch M, Rostovskaya M, Overall RW, Buskamp V, Anastasiadis K, Karl MO. Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis. *Stem Cell Reports*. 2016; 6:525-538.
- 22- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopez SM, Little MH. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015 ; 526 : 564-568.

- 23- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med.* 2017; 376:1038-1046.
- 24- Mazurier C, Douay L. In vitro generation of blood red cells from stem cells: a sketch of the future. *Biol Aujourdhui.* 2016; 210: 9-17.
- 25- Takayama N, Eto K. Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69:3419-3428.
- 26- Saxena P, Heng BC, Bai P, Folcher M, Zulewski H, Fussenegger M. A programmable synthetic lineage-control network that differentiates human iPSCs into glucose-sensitive insulin-secreting beta-like cells. *Nat Commun.* 2016; 7: 11247.
- 27- *Stem Cell Reports.* 2017 May 9; 8(5): 1190–1201. Published online 2017 Apr 13. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.03.013.
- 28- Abraham E, Ahmadian BB, Holderness K, Levinson Y, McAfee E. Platforms for manufacturing allogenic, autologous and iPSC therapy products: an industry perspective. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Doi: 10.1007/10_2017_14.
- 29- <https://www.globaldata.com> : stem cells technologies and applications: market 2016-2026.
- 30- <https://www.nature.com/news/trials-of-embryonic-stem-cells-to-launch-in-china-1.22068>
- 31- *Stem Cell Reports.* 2017 May 9; 8(5): 1190–1201. Published online 2017 Apr 13. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.03.013
- 32- https://www.evotec.com/article/en/Press-releases/Evotec-achieves-first-milestone-in-Diabetes-alliance-with-Sanofi/2953?website_part_id=1
- 33- www.cellmanufacturingusa.org: Achieving large-scale, cost-effective,

- reproducible manufacturing of high quality cells: a technology road-map to 2025
- 34- www.haematologica.org/content/101/2/115: The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research: a consensus document
 - 35- Abbasalizadeh S, Larijani MR, Samadian A, Baharvand H Bioprocess Development for Mass Production of Size-Controlled Human Pluripotent Stem Cell Aggregates in Stirred Suspension Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012; 18:831-851.
 - 36- Amit M, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, Peri M, Itskovitz-Eldo J. Dynamic suspension culture for scalable expansion of undifferentiated human pluripotent stem cells *Nat. Protoc*. 2011; 6: 572-579.
 - 37- Shafa M, Sjonnesen K, Yamashita A, Michalak M, Kallos MS, Rancourt DE. Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2012; 6:462-472.
 - 38- Stem cell patent competitive intelligence – December 2016 update. <https://www.linkedin.com/pulse/stem-cell-patent-competitive-intelligence-december-2016-schauinger>
 - 39- Shafa M, Sjonnesen K, Yamashita A Liu S, Michalak M, Kallos MS, Rancourt DE. Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors. *J Tissue Regen Med*. 2012 Jun; 6(6): 462-72. doi: 10.1002/term.450. Epub 2011 Jul 14.
 - 40- Guidelines for stem cell research and clinical translation. ISSCR. May 2016. In www.isscr.org.
 - 41- Règlement européen (CE) n°1394/2007 sur les médicaments de thérapie innovante.
 - 42- Code de la Santé publique. Article L 4211-9-2 résultant de la loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 - art. 155.
 - 43- Loi n° 2011-302 du 22 mars 2011 portant diverses dispositions d'adaptation de la législation au droit de l'Union européenne en matière de santé, de travail et de communications électroniques. 23 mars 2011.

- 44- Directive 2004/23/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 novembre 2001 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 humains. Journal Officiel de l'Union Européenne. 7 avril 2004.
- 45- Directive 2001/83/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Journal Officiel de la Communauté Européenne du 28 novembre 2001.
- 46- Décret n° 2012-1236 du 6 novembre 2012 relatif aux médicaments de thérapie innovante. JORF n°0260 du 8 novembre 2012.
- 47- Décret n° 2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif aux médicaments de thérapie innovante. JORF. 17 novembre 2016.
- 48- Décision de l'ANSM du 5 mai 2017 modifiant la décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonne pratique relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire.
- 49- Loi relative à la bioéthique du 6 août 2013 amendant la loi n°2011-814.

Abréviations

- AMM** : autorisation de mise sur le marché ;
- ANSM** : agence nationale de sécurité des médicaments ;
- ARN** : acide ribonucléique ; **BPF** : bonnes pratiques de fabrication ;
- BPI** : banque publique d'investissement;
- CAT** : *“Comittee for advanced therapies”*;
- CEPS** : comité économique des produits de santé ;
- CMO** : comité de mise en oeuvre;
- CPP** : comité de protection des personnes ;
- CRISPR-Cas 9** : *“Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein 9”* ;
- EMA** : *“European medicines agency”*;
- GIE** : groupement d'intérêt économique ;
- GMP** : *“Good manufacturing practice”* ;
- EP** : établissement pharmaceutique ; **GSCF** : « granulocyte colony stimulating factor » ;
- GVH** : *“Graft versus host”* ;
- HAS** : haute autorité de santé ;
- HLA** : *“Human leucocyte antigen”* ;
- HSC** : *“Hematopoietic stem cell”*; **iPS** : *“Induced pluripotent stem cell”* ;
- ISCR** : *“International society for stem cell research”* ;
- MSC** : *“Mesenchymatous stem cell”* ;
- MTI** : médicament de thérapie innovante ;
- MTI-PP** : médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement ;

SA : société anonyme ;

UNCAM : union nationale des caisses d'assurance maladie ;

VIH : virus immunodéfi



