

M/S : médecine sciences



Le contrôle de la qualité des produits de thérapie génique: approche de l'AFSSAPS

Quality control of gene therapy products: approach of the french agency for the safety of health products

Xavier Chenivesse, Valérie Ridoux et Marie-Hélène Tissier

Volume 19, numéro 4, avril 2003

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/006502ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

SRMS: Société de la revue médecine/sciences
Éditions EDK

ISSN

0767-0974 (imprimé)
1958-5381 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Chenivesse, X., Ridoux, V. & Tissier, M.-H. (2003). Le contrôle de la qualité des produits de thérapie génique: approche de l'AFSSAPS. *M/S : médecine sciences*, 19(4), 481–488.

Résumé de l'article

La thérapie génique est une nouvelle stratégie thérapeutique qui peut constituer dans certaines indications une alternative ou un complément aux traitements « classiques ». Malgré le succès récent obtenu en France dans le traitement d'un déficit immunitaire, confirmant que la thérapie génique peut se révéler, dans certains cas, extrêmement efficace, la survenue d'effets secondaires graves dans ce même essai, ainsi que le décès d'un jeune patient au cours d'un essai de thérapie génique mené aux États-Unis mettent l'accent sur la nécessité de rester très vigilant quant au bien-fondé des essais (évaluation du protocole) et à la qualité des produits administrés au patient. En France, cette mission est confiée à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, autorité nationale chargée de garantir la sécurité sanitaire de l'ensemble des produits de santé. La thérapie génique, actuellement en phase d'essais cliniques, est une approche thérapeutique innovante rendue possible par l'amélioration des systèmes permettant de transférer et d'exprimer un gène dans des cellules eucaryotes et grâce aux progrès acquis dans la connaissance, au niveau génétique, de certaines maladies. Le gène transféré étant alors assimilé à un médicament, on parle dans ce cas d'ADN médicament ou de gène thérapeutique.

Tous droits réservés © M/S : médecine sciences, 2003

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter en ligne.

<https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

érudit

Cet article est diffusé et préservé par Érudit.

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche.

<https://www.erudit.org/fr/>

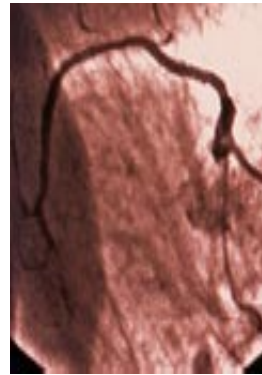
> La thérapie génique est une nouvelle stratégie thérapeutique qui peut constituer dans certaines indications une alternative ou un complément aux traitements « classiques ». Malgré le succès récent obtenu en France dans le traitement d'un déficit immunitaire, confirmant que la thérapie génique peut se révéler, dans certains cas, extrêmement efficace, la survenue d'effets secondaires graves dans ce même essai, ainsi que le décès d'un jeune patient au cours d'un essai de thérapie génique mené aux États-Unis mettent l'accent sur la nécessité de rester très vigilant quant au bien-fondé des essais (évaluation du protocole) et à la qualité des produits administrés au patient. En France, cette mission est confiée à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, autorité nationale chargée de garantir la sécurité sanitaire de l'ensemble des produits de santé. La thérapie génique, actuellement en phase d'essais cliniques, est une approche thérapeutique innovante rendue possible par l'amélioration des systèmes permettant de transférer et d'exprimer un gène dans des cellules eucaryotes et grâce aux progrès acquis dans la connaissance, au niveau génétique, de certaines maladies. Le gène transféré étant alors assimilé à un médicament, on parle dans ce cas d'ADN médicament ou de gène thérapeutique. <

L'AFSSAPS

Comme c'est le cas pour tout médicament amené à être administré à un patient, la qualité, l'efficacité et la sécurité du produit de thérapie génique doivent être évaluées et contrôlées. Ce rôle incombe à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), un des rouages essentiels du dispositif de sécurité sanitaire français (Figure 1), constitué par ailleurs de l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) et de l'InVS (Institut de veille sanitaire), l'ensemble étant

Le contrôle de la qualité des produits de thérapie génique : approche de l'AFSSAPS

Xavier Chenivresse, Valérie Ridoux, Marie-Hélène Tissier



coordonné par une structure interministérielle, le Comité national de la sécurité sanitaire (Loi n° 98-535 du 1^{er} juillet 1998).

L'AFSSAPS, qui est placée sous la tutelle du ministère de la Santé, a remplacé en 1998 l'Agence du médicament, augmentant par là même son champ d'action puisque ses missions portent sur l'ensemble des produits de santé ou à finalité sanitaire et cosmétique et concernent donc aussi bien les médicaments chimiques que les vaccins, les protéines recombinantes, les produits sanguins labiles, les organes et tissus, les produits de thérapie génique et cellulaire, les réactifs de laboratoire, les dispositifs médicaux et les produits cosmétiques. L'AFSSAPS intervient en évaluant sur dossier les produits avant leur commercialisation (cette évaluation pouvant déboucher sur une « AMM », autorisation de mise sur le marché); elle inspecte aussi les sites de production et de manipulation des produits de santé, afin de vérifier que ces produits sont fabriqués et utilisés dans le respect des bonnes pratiques et des réglementations en vigueur, et contrôle le produit en laboratoire pour s'assurer de sa qualité pharmaceutique. Cette dernière mission est prise en charge, de façon programmée ou en urgence, par la Direction des

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), Unité biologie cellulaire et moléculaire, Direction des Laboratoires et des Contrôles, 635, rue de la Garenne, 34740 Vendargues, France. valerie.ridoux@afssaps.sante.fr

laboratoires et des contrôles (DLC) au sein de ses propres laboratoires situés à Saint-Denis, Lyon et Montpellier/Vendargues.

La thérapie génique

La thérapie génique repose sur quatre éléments fondamentaux: le gène transféré, le vecteur utilisé pour véhiculer le gène, la cellule cible et la méthode de transfert. Le gène transféré peut être de différentes natures, principalement:

- un gène normal codant pour une protéine fonctionnelle faisant défaut chez le patient (maladie génétique);
- un gène « tueur » (également appelé gène suicide) dont le transfert, souvent associé à l'administration au patient d'une chimiothérapie, va conduire à la mort de la cellule, cancéreuse le plus souvent, dans laquelle il s'exprime;
- un gène codant pour une molécule physiologique agissant à distance comme les cytokines (immunothérapie du cancer);
- un gène codant pour un agent vaccinal anti-tumoral, anti-viral ou anti-parasitaire (vaccinothérapie);
- un gène marqueur permettant d'évaluer l'efficacité du transfert et de suivre le devenir d'une population cellulaire donnée.

Pour véhiculer ces différents gènes d'intérêt, plusieurs types de vecteurs sont actuellement utilisés chez l'homme. Il s'agit de vecteurs viraux (vecteurs dérivés notamment de rétrovirus murins, d'adénovirus, de poxvirus et de virus adéno-associés), de vecteurs plasmidiques ou de complexes plasmides/vecteurs synthétiques (principalement lipides cationiques et polymères cationiques).

Le choix des cellules ciblées par ces vecteurs est généralement lié à la maladie et/ou à l'organe concerné, sachant que les maladies qui font actuellement l'objet de ces protocoles peuvent être des déficits héréditaires (mucoviscidose, déficits immunitaires...), des maladies infectieuses (Sida, hépatite B), des cancers.

Deux méthodes de transfert sont utilisées dans les protocoles: le transfert *in vivo* qui consiste à injecter directement, au niveau de l'organe ou du tissu cible, le produit de thérapie génique et le transfert *ex vivo* qui consiste à transfecter *in vitro* des cellules (autologues, allogéniques ou xénogéniques) avec un vecteur portant le gène d'intérêt, puis à implanter ces cellules génétiquement modifiées (CGM) chez le patient (Figure 2).

En France, à ce jour, 53 demandes d'essai clinique en thérapie génique ont été déposées, 34 ont été acceptées, 9 refusées (dossiers incomplets), 10 sont en cours d'instruction (→).

Ces protocoles concernent majoritairement le traitement de cancers (plus de 60 % des essais) et font inter-

venir dans plus de 75 % des cas des vecteurs dérivés de virus ou des cellules génétiquement modifiées par des vecteurs viraux (Figure 2). Depuis 1989, date de la première autorisation d'essai clinique de thérapie génique, 600 essais (dont 5 de phase II/III et 4 de phase III) concernant 3494 patients ont été réalisés ou sont en cours dans le monde [1, 2].

Bien que le bilan des essais cliniques réalisés chez l'homme durant ces dix dernières années soit relativement décevant, la stratégie même de transfert de gène n'est pas, à ce jour, remise en question.

L'analyse des résultats obtenus au cours des essais a en revanche permis d'identifier certains écueils, en particulier la toxicité et la relative inefficacité des premières générations de vecteurs. Si l'heure est aujourd'hui à l'amélioration de l'efficacité et de l'innocuité des produits développés, la poursuite des essais cliniques nécessite de rester très vigilant quant à la qualité pharmaceutique des produits de thérapie génique.

Cadre réglementaire, guides et recommandations

Il existe un arsenal de textes législatifs encadrant la thérapie génique et les produits de thérapie génique [3].

En premier lieu, la loi 96-452 du 28 mai 1996 définit pour la première fois les produits de thérapie génique comme des « produits biologiques à effet thérapeutique visant à transférer du matériel génétique ». Le décret d'application a été par ailleurs publié (décret 2001-909 du 1^{er} octobre 2001).

Le produit de thérapie génique, de sa fabrication à son administration au patient, est, de par sa nature et sa

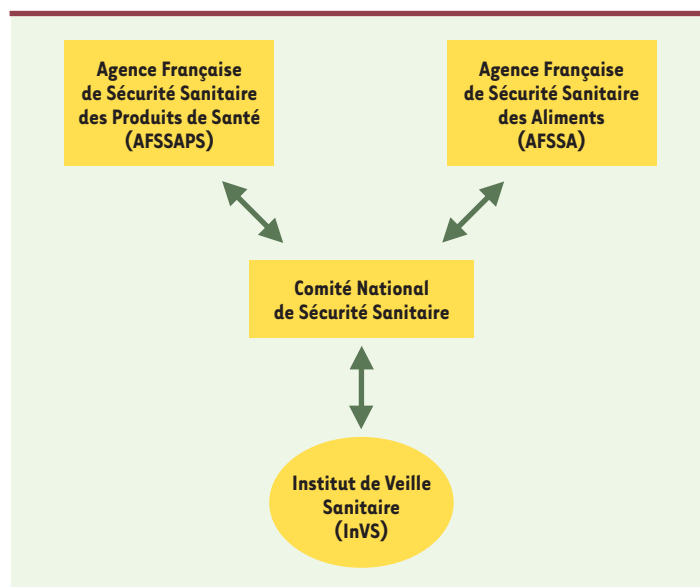


Figure 1. Dispositif de sécurité sanitaire en France.

fonction, soumis aux différents textes législatifs portant sur les organismes génétiquement modifiés (OGM), les agents biologiques ou le médicament (Tableau I).

En tant que produit obtenu par des procédés biotechnologiques, son autorisation de mise sur le marché (AMM) devrait suivre la procédure européenne dite centralisée, qui accorde une autorisation unique de commercialisation du produit pour l'ensemble des pays de l'Union européenne.

Par ailleurs, il existe un certain nombre de guides et de recommandations français, européens et étasuniens portant sur les produits de thérapie génique au service des différents acteurs du développement de la thérapie génique: industriels, promoteurs d'essais, cliniciens.

Contrôles en laboratoire de la qualité du produit de thérapie génique

Comme pour tout autre médicament, le fabricant d'un produit de thérapie génique doit s'assurer au cours de la production de la qualité et de la sécurité de chaque lot de produit destiné à être administré à un patient. L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS), qui dispose de ses propres laboratoires, contrôle également ces produits. Les contrôles peuvent être effectués avant ou après l'AMM.

En raison du caractère innovant de cette nouvelle approche thérapeutique, il n'existe pas encore de réfé-

rentiel de contrôle de la qualité des produits de thérapie génique, comme par exemple des monographies de la pharmacopée européenne. Aussi, afin de participer à l'établissement de ces référentiels, l'AFSSAPS a réuni un groupe de travail « Contrôles des produits de thérapie génique », constitué d'experts extérieurs [4, 5], et de scientifiques de l'AFSSAPS. Ce groupe a émis des propositions sur les contrôles devant être réalisés par une autorité nationale indépendante, en vue de garantir la « qualité pharmaceutique » des produits de thérapie génique. La réflexion s'est articulée autour de quatre « familles » de produits de thérapie génique: les plasmides, les complexes plasmides/vecteurs synthétiques, les vecteurs viraux, les cellules génétiquement modifiées (CGM) avec le cas particulier des CGM encapsulées.

Comme pour l'ensemble des produits de santé contrôlés par un laboratoire national de contrôle, les contrôles retenus en matière de thérapie génique concernent en majeure partie le produit qui sera administré au patient, c'est-à-dire le produit fini, même si le contrôle de certains « produits intermédiaires » de la production ne peut être exclu, notamment dans un domaine où les techniques restent à mettre au point et/ou montrent une sensibilité limitée.

Les contrôles jugés prioritaires dans le cadre d'une mission de contrôle des produits de thérapie génique par une autorité nationale incluent notamment la qualité (identité et pureté), l'activité biologique (efficacité de transfert et d'expression, et fonctionnalité de la protéine codée par le transgène), la stérilité et certains éléments de sécurité des produits.

Les méthodes les plus couramment utilisées pour réaliser ces contrôles sont présentées sur les Tableaux II, III et IV (respectivement contrôles des plasmides et des vecteurs synthétiques, contrôles des vecteurs viraux et contrôles des cellules génétiquement modifiées). Bien entendu, cette liste est amenée à évoluer en fonction des développements de nouvelles techniques plus sensibles et plus performantes.

Contrôles généraux

Certains contrôles portent sur la stérilité des produits tels que la recherche des contaminants bactériologiques et fongiques, la

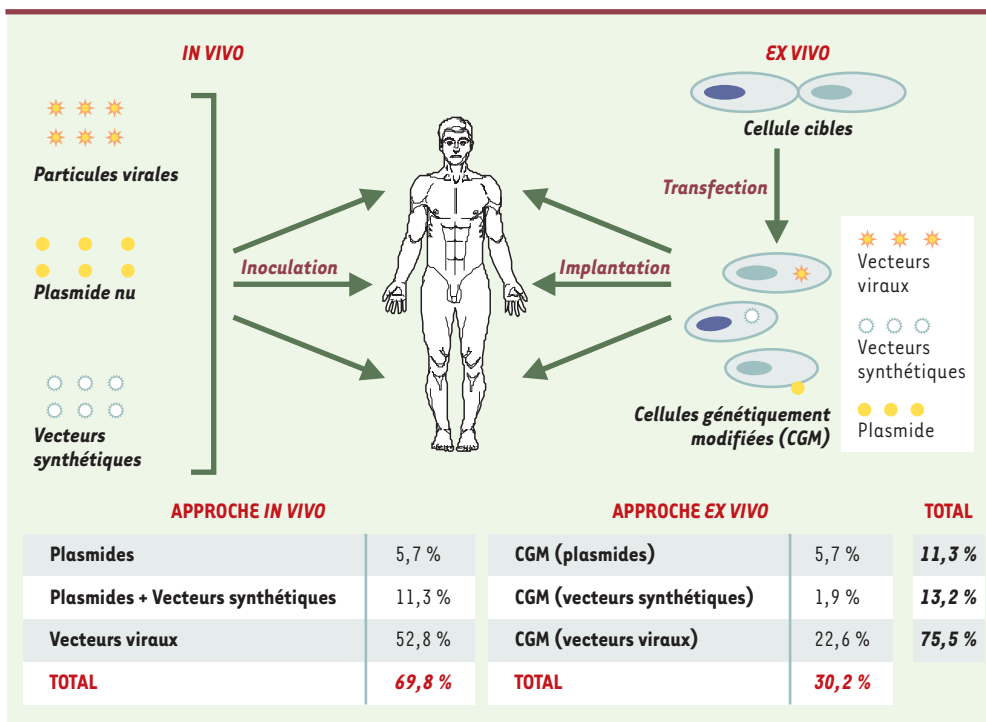


Figure 2. Produits de thérapie génique utilisés dans les essais cliniques.

détection des mycoplasmes et la recherche d'endotoxines. Ils sont réalisés systématiquement quelle que soit la nature du produit analysé.

La vérification de l'intégrité du matériel génétique transféré se fera sur chaque lot clinique par séquençage, seule technique pouvant garantir qu'aucun réarrangement n'est apparu au cours de la production. Le degré de séquençage variera selon le produit (totalité de la séquence pour les plasmides, séquence des régions d'intérêt pour les vecteurs viraux et les cellules génétiquement modifiées)

L'activité des produits de thérapie génique sera évaluée systématiquement *in vitro* par quantification du niveau d'expression du transgène :

- après transfection dans des lignées témoins pour les plasmides et les complexes plasmides/vecteurs synthétiques;
- après infection de lignées permissives pour les vecteurs viraux;
- dans les cellules génétiquement modifiées destinées à être greffées chez les patients.

Le nombre de copies de génomes viraux présents dans les cellules *in vitro* pourrait parallèlement être estimé à l'aide de la PCR en temps réel.

Enfin, pour les plasmides et les complexes plasmides/ vecteurs synthétiques, des tests *in vivo* sur petit rongeur seront réalisés, l'efficacité de transfert et d'expression dépendant fortement du tissu ciblé pour l'expression du transgène.

Contrôles spécifiques

Certains contrôles spécifiques d'une famille de produits ou utilisant des méthodes particulières peuvent varier selon la nature du produit.

Tableau I. Cadre réglementaire et recommandations. CGG: Commission de génie génétique; FDA: Food and drug administration; CBER: Center for biologics evaluation and research; NIH: National institutes of health; RAC: Recombinant DNA advisory committee; EMEA: European medicine evaluation agency; CPMP: Committee for proprietary medicinal products; OMS: Organisation mondiale de la Santé.

TEXTES RÉGLEMENTAIRES

Produit de thérapie génique

- Loi n° 96-452 du 28 mai 1996 Titre IV - Article L.676-1: Définition, essais cliniques, agréments d'établissements.
- Décret n° 2001-909 du 1^{er} octobre 2001: cellules, produits de thérapie génique et cellulaire - autorisations.

Agent biologique

- Décret 94-352 du 4 mai 1994: Protection des travailleurs exposés à des agents biologiques.
- Arrêté du 13 août 1996: Mesures techniques de prévention, notamment de confinement...

Organisme génétiquement modifié (OGM)

- Loi 92-654 du 13 juillet 1992: Contrôle de l'utilisation et de la dissémination des OGM.
- Décrets 93-773 et 93-774 du 23 mars 1993: Contrôle de l'utilisation et de la dissémination des OGM, Critères de classement.
- Arrêtés du 27 décembre 1994 et du 28 août 1996: Demande d'agrément d'utilisation confinée d'OGM.
- Décret 95-1172 du 6 novembre 1995: Autorisation de dissémination volontaire de médicament (...) composé (...) d'OGM.
- Arrêté du 28 août 1996: Dossier d'agrément.

Produit obtenu par procédés biotechnologiques

- Règlement CEE n° 2309/93: Procédure centralisée d'autorisation de mise sur le marché (AMM).
- Communication 98/C 229/03 (22/07/98): Procédures communautaires d'AMM des médicaments.

GUIDES ET RECOMMANDATIONS

CGG (www.recherche.gouv.fr)

- Principes de classement et guides officiels de la Commission de génie génétique (2000).

FDA/CBER (www.fda.gov/cber)

- *Point to consider in human somatic cell therapy and gene therapy* (1991).
- *Point to consider in the production and testing of new drugs and biologicals produced by recombinant DNA technology* (1985).
- *Supplement Nucleic acid characterization and genetic stability* (1992).
- *Point to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals* (1993).
- *Application of current statutory authorities to human cell therapy product and gene therapy products* (1993).
- *Point to consider in the design and submission of protocols for the transfer of recombinant DNA molecules into the genome of one or more human subjects* (1996).
- *Point to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications* (1996).
- *Guidance for human somatic cell therapy* (1998).

NIH/RAC (www.nih.gov)

- *NIH guidelines for research involving recombinant DNA molecules.*

EMEA/CPMP (www.emea.eu.int)

- *Safety studies for gene therapy products. Annex to note for guidance on gene therapy product quality aspects in the production of vectors and genetically modified somatic cells* (1998).
- *Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products* (2001).
- *Point to consider on the manufacture and quality control of human somatic cell therapy medicinal products* (2001).

OMS

- *Guidelines for assuring the quality of DNA vaccines* (1998).

United States Pharmacopeial Convention

- *Pharmacopeial previews: cell and gene therapy products* (2000).

Plasmides

Les impuretés susceptibles de contaminer les préparations de plasmides sont l'ADN et l'ARN bactériens résiduels, des contaminants protéiques (ribonucléase exogène, protéines bactériennes), certains composés utili-

sés au cours de la purification (bromure d'éthidium, chlorure de césium par exemple) et d'éventuelles traces d'antibiotiques utilisés au cours de la production. L'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide et l'analyse spectrophotométrique, qui donnent une idée générale de la pureté des préparations, peuvent être complétées par des tests quantitatifs comme une analyse par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) (ARN), des dosages colorimétriques (protéines) et des dosages d'antibiotiques résiduels.

PLASMIDES

Identité	
Identité de l'ADN	Séquençage Carte de restriction
Concentration de l'ADN	Photométrie
Topologie de l'ADN	Électrophorèse en gel d'agarose
Pureté	
Détection ADN simple brin	Électrophorèse en gel d'agarose HPLC
Détection ARN bactérien contaminant	Électrophorèse en gel d'agarose HPLC
Détection ADN génomique bactérien contaminant	<i>Southern blot</i>
Détection protéines contaminantes	Photométrie Colorimétrie SDS-PAGE Électrophorèse en gel d'agarose
Détection phénol, sels contaminants	Spectrophotométrie
Détection antibiotiques résiduels	Dosage antibiotiques
Activité	
Expression de la protéine d'intérêt <i>in vitro</i>	SDS-PAGE <i>Western blot</i> ELISA Immunocytochimie Cytométrie de flux
Expression de la protéine d'intérêt <i>in vivo</i>	Immuno-histochimie SDS-PAGE <i>Western blot</i>
Fonctionnalité de la protéine d'intérêt	si modèles cellulaires ou animaux
Sécurité/Stérilité	
Recherche contaminants bactériens et fongiques	Test de stérilité
Recherche endotoxines	Endotoxines (LAL)
Recherche mycoplasmes	Culture en milieux spécifiques Cultures cellulaires Épifluorescence PCR

VECTEURS SYNTHÉTIQUES*

Identité et pureté	
Identité vecteur synthétique	HPLC Chromatographie couche mince
Rendement complexation et stabilité complexe	HPLC
Pureté vecteur synthétique	HPLC Chromatographie couche mince

Tableau II. Contrôles des plasmides et des vecteurs synthétiques. * Les contrôles spécifiques aux vecteurs synthétiques sont indiqués. Ces vecteurs étant administrés sous forme de complexes plasmide/vecteur, ces contrôles complètent ceux listés pour les plasmides.

Vecteurs synthétiques

L'analyse par HPLC pourrait constituer une méthode de choix permettant de contrôler l'identité de l'ensemble des vecteurs synthétiques. Pour les lipides cationiques, la réalisation d'une chromatographie sur couche mince de silice peut être envisagée.

En raison du risque de dissociation, de dégradation ou de formation d'agrégats, il convient de contrôler la stabilité du complexe ADN/vecteur. Une HPLC peut être envisagée pour déterminer le rendement de complexation et la stabilité du vecteur ADN/vecteur synthétique.

Vecteurs viraux

Le titre de la suspension de vecteurs viraux peut être déterminé par spectrophotométrie, mais il est indispensable de compléter cette mesure en établissant le titre biologique c'est-à-dire le nombre de particules infectieuses présentes par unité de volume (notamment par la méthode des plages de lyse pour les vecteurs dérivés de virus lytiques, par *Southern blot* pour les vecteurs viraux intégratifs).

L'analyse spectrophotométrique devrait permettre de s'assurer de l'absence d'impuretés (principalement des capsides vides et des composés pouvant être utilisés au cours de la purification du vecteur).

La recherche de particules virales compétentes pour la répllication (RCV) dans les stocks de vecteurs viraux et la recherche de virus adventices demeurent l'une des principales préoccupations de l'AFSSAPS. Le développement de tests de détection *in vitro* est prévu (détection sur cellules indicatrices, par PCR ou par RT-PCR).

Cellules génétiquement modifiées

Les cellules génétiquement modifiées (CGM) peuvent être aussi bien des cellules d'emballage produisant des vecteurs viraux que des CGM autologues, allogéniques ou xénogéniques, exprimant le transgène. Certaines CGM dites encapsulées sont emprisonnées dans des polymères semi-perméables, ce qui évite à la fois leur contact avec des cellules du système immunitaire et leur dissémination dans l'organisme du patient. Les contrôles vérifiant l'identité et la viabilité des cel-

lules destinées à être greffées chez le patient sont essentiels. Différents tests peuvent être envisagés relatifs au niveau génomique (séquençage de la région d'intérêt, génotypage, analyse des chromosomes) et protéique (expression de la protéine d'intérêt dans les CGM, phénotypage et analyse des isoenzymes).

La recherche de virus adventices sur cellules indicatrices doit être réalisée *in vitro* après identification des « portes d'entrée » possibles de contaminations au cours de la production (origine des cellules, sérum, trypsine).

Dans le cas des cellules encapsulées, la stérilité de l'implant, la résistance et la perméabilité sélective de la capsule (absence de cellules ou d'autres éléments que la protéine d'intérêt relargués à l'extérieur de la capsule) ainsi que le relargage de la protéine codée par le transgène doivent être démontrés.

Tests *in vivo*

Les tests de toxicité ainsi que la recherche de particules compétentes pour la répllication après administration chez l'animal et la recherche de virus adventices *in vivo*, l'étude des risques de dissémination dans l'organisme et dans l'environnement concernent davantage la phase de développement du produit conduite par le fabricant. Ces tests ne semblent donc pas prioritaires pour une autorité nationale dans la mesure où le dossier du fabricant se doit de documenter ces contrôles et d'argumenter l'absence de risque au vu des indications thérapeutiques proposées. Ils pourraient cependant être réalisés par l'AFSSAPS dans des contextes « d'urgence » ou pour vérifier certains éléments corrélés à l'activité des produits.

Mise en place du contrôle

des produits de thérapie génique à l'AFSSAPS

L'ensemble des contrôles listés nécessitent des compétences dans des domaines aussi variés que la biologie moléculaire, l'analyse des protéines, la biologie cellulaire, les tests *in vivo*, l'histologie, la microbiologie ou la physico-chimie. Les laboratoires de la Direction des laboratoires et des contrôles (DLC), contrôlent à ce jour l'ensemble des produits de santé et possèdent donc des compétences dans l'ensemble de ces domaines. Le travail a été engagé en utilisant, dans un premier temps, des produits du commerce : plasmides et vecteurs viraux porteurs d'un gène rapporteur, vecteurs synthétiques et cellules. Par ailleurs, des analyses de produits utilisés en essai clinique ont débuté en 2001 en collaboration avec les investigateurs et les promoteurs.

La mise en place des contrôles des produits de thérapie génique présente de nombreuses difficultés liées essentiellement au manque de référentiels, de standards et de méthodes validées.

Quelques référentiels tels que le dossier du fabricant et des *guidelines* FDA, OMS, EMEA sont disponibles (*Tableau I*), mais comme cela a été rappelé plus haut, il n'y a pas à l'heure actuelle de référentiels spécifiques aux contrôles des produits de thérapie génique. Il est donc primordial que les principaux acteurs et partenaires impliqués dans le développement de la thérapie génique puissent disposer d'un guide spécifique portant sur le contrôle de ces produits.

Par ailleurs, et cela va de pair, il faut tendre vers une homogénéisation des contrôles. À ce titre, certaines techniques générales de la Pharmacopée européenne pourront être adaptées au contrôle des produits de thérapie génique (analyse de stérilité, recherche d'endotoxines par exemple). En revanche, d'autres méthodes plus spécifiques de ce type de produits devront être développées et validées. Ce pourrait être le cas pour la détection de virus adventices et la recherche de particules virales recombinantes compétentes pour la répllication, sujets qui concernent la DLC et auxquels celle-ci pourrait participer en développant de nouveaux « systèmes révélateurs » utilisant des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

Des standards de référence (qualitatifs, quantitatifs ou d'activité), aujourd'hui quasi inexistant, sont à créer

VECTEURS VIRAUX

Identité et pureté	
Identité de l'ADN	Séquençage Carte de restriction
Titration physique suspension virale	Photométrie
Titration biologique suspension virale	Plage de lyse/Effets cytopathiques <i>Southern blot</i>
Pureté vecteur viral (capsides virales vides)	Photométrie
Activité	
Efficacité de transfert du transgène <i>in vitro</i>	PCR en temps réel
Expression de la protéine d'intérêt <i>in vitro</i>	SDS-PAGE <i>Western blot</i> ELISA Immunocytochimie
Fonctionnalité de la protéine d'intérêt	si modèles cellulaires ou animaux
Sécurité/stérilité	
Recherche contaminants bactériens et fongiques	Test de stérilité
Recherche endotoxines	Endotoxines (LAL)
Recherche mycoplasmes	Culture en milieux spécifiques Cultures cellulaires Épifluorescence, PCR
Recherche virus adventices <i>in vitro</i>	Tests sur cellules indicatrices PCR
Recherche particules répllicatives <i>in vitro</i>	Tests sur cellules permissives PCR

Tableau III. Contrôles des vecteurs viraux.

(en particulier pour les vecteurs viraux) et des normes précises sont à définir.

Ainsi, l'AFSSAPS souhaite travailler à la standardisation de ces contrôles par la mise en place, au sein d'un réseau de laboratoires, de travaux collaboratifs permettant de valider aussi bien des préparations de référence que des procédures spécifiques de contrôle des produits de thérapie génique.

Il faut enfin rappeler que le contrôle des produits de thérapie génique est une mission de sécurité sanitaire qui sera amenée à intervenir dans un contexte européen. En effet, les produits de thérapie génique étant obtenus par des procédés biotechnologiques, leur autorisation de mise sur le marché suivra normalement la procédure centralisée appliquée au sein de l'Union européenne. Une réflexion européenne commune doit donc être

menée pour homogénéiser les exigences qualité/efficacité/ sécurité concernant ces produits.

Conclusions

Il convient dès maintenant de s'organiser et de définir les contrôles pertinents à appliquer aux produits de thérapie génique afin de garantir la qualité du traitement et la sécurité des patients.

L'AFSSAPS, qui a pour mission de contrôler la qualité pharmaceutique des produits de santé, souhaite mettre en place des groupes de travail et des études collaboratives afin de créer les référentiels et les standards nécessaires à la validation des contrôles. ♦

CGM

Identité	
Identité cellulaire	Séquençage Marqueurs spécifiques <i>Western blot</i> <i>Southern blot</i> Isoenzyme Analyse des chromosomes
Viabilité cellulaire	Colorations vitales Cytométrie de flux
Activité	
Expression de la protéine d'intérêt <i>in vitro</i>	SDS-PAGE <i>Western blot</i> ELISA Immunocytochimie Cytométrie en flux
Fonctionnalité de la protéine d'intérêt	si modèles cellulaires ou animaux
Sécurité/stérilité	
Recherche contaminants bactériens et fongiques	Test de stérilité
Recherche endotoxines	Endotoxines
Recherche mycoplasmes	Culture en milieux spécifiques Cultures cellulaires Épifluorescence, PCR
Recherche virus adventices <i>in vitro</i>	Tests sur cellules indicatrices PCR

CGM ENCAPSULÉES*

Identité	
Qualité et survie cellules encapsulées <i>in vitro</i>	Analyses cytologiques
Propriétés physico-chimiques capsule	HPLC
Activité	
Relargage <i>in vitro</i> protéine à travers la capsule	ELISA/ <i>Western blot</i> /HPLC

Tableau IV. Contrôles des cellules génétiquement modifiées (CGM). * Les contrôles spécifiques des CGM encapsulées sont indiqués. Ils s'ajoutent aux contrôles réalisés sur les CGM.

SUMMARY

Quality control of gene therapy products: approach of the french agency for the safety of health products

Gene therapy is a new therapeutic strategy which can constitute in some diseases a true alternative or a complement to the "classical treatments". Regarding the innovative features, the complexity and the extreme diversity of the gene therapy products (naked DNA, synthetic vectors, viral vectors, genetically modified cells), these new products presently in clinical trials have to be precisely evaluated and controlled for their medicine quality as well as their biological origin and/or their specific characteristics of genetically modified organisms. The French Agency for the Safety of Health Products engaged an in-depth scientific review concerning the control of this very heterogeneous class of potential therapeutics through the creation of a working group. The objectives of this group were to determine the testings to be performed by a national authority for each type of gene therapy products and to select the appropriate techniques or methods to be developed. Controls considered as essential are listed and include the verification of the identity, the purity, the transfer and expression efficiency as well as the microbiological and viral safety of the products. This implies the development of diverse techniques of molecular biology, cellular biology, physico-chemistry, animal testing, histology and microbiology. Finally, in order to define the basis of testings of these emerging products, the marketing of which should be effective for some of them in the next years, it appears extremely important to harmonize the quality, efficiency and safety criteria, to develop specific references and standards and to create specific guidelines for the control of gene therapy products. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions Yves Beuzard (Hôpital Saint-Louis, Paris), Catherine Boccacio (Institut Gustave Roussy, Villejuif), Marina Cavazzana-Calvo (Hôpital Necker, Paris), Barbara Demeneix (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), Jean-Michel Heard (Institut Pasteur, Paris) et Daniel Larzul (Institut Pasteur, Paris) pour leur participation au groupe de travail « Contrôles des produits de thérapie génique ».



RÉFÉRENCES

1. Site Wiley (<http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>) 20 février 2002.
2. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288: 669-72.
3. Cohen Hagenauer O. Réglementation de la thérapie génique. *Med Sci* 1999; 15: 682-90.
4. Décision du 24 juillet 2000 portant création d'un groupe de travail sur les contrôles des produits de thérapie génique à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. *Journal Officiel de la République Française*, 9 août 2000.
5. Décision n° 2000.95 du 25 juillet 2000 portant nomination au groupe de travail sur les contrôles des produits de thérapie génique à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. *Bulletin Officiel de l'AFSSAPS*, 2000.

TIRÉS À PART
X. Chenivesse

Une technologie de **pointe** pour une recherche de pointe

Microarray Systems

BIO-RAD

Bio-Rad 3, Boulevard Raymond Poincaré • 92430 Marnes-la-Coquette
Tél : 01 47 95 69 65 • Fax : 01 47 95 61 21 • Email : eric_niedo@bio-rad.com