

THÈSE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Fabien Brelet

Présentée et soutenue publiquement le 23/03/2015

IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES : INTERET ET PRODUCTION DE LYMPHOCYTES T ANTI-CMV
--

Président :

Mr Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie - Praticien Hospitalier

Membres du jury :

Mr Frédéric DEHAUT, Professeur associé,

Directeur EFS centre Atlantique

Mme Sophie DERENNE, PRI – Directeur EFS Atlantic Bio GMP

Sommaire

Liste des figures	3
Liste des tableaux	3
Remerciements	4
Introduction	6
1. Revue Bibliographique	9
1.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	9
1.1.1. Caractéristiques des CSH	9
1.1.2. Les greffes de CSH.....	13
1.2. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) :	19
1.2.1. Propriétés	19
1.2.2. Activation in-vivo.....	20
1.2.3. Utilisation des CTL en thérapeutique : immunothérapie adoptive.....	21
1.2.4. Production de CTL à visée thérapeutique.....	23
1.3. Le cytomégalovirus	34
1.3.1. Classification	34
1.3.2. Structure.....	34
1.3.3. Epidémiologie.....	35
1.3.4. Dissémination au sein de l'organisme	35
1.3.5. Manifestations cliniques	36
1.3.6. Diagnostic	37
1.3.7. Traitements	37
2. Analyse SWOT : place du transfert adoptif de CTL dans le traitement des complications infectieuses après greffe de CSH : exemple des CTL anti-CMV	40
3. Production de CTL anti-CMV au sein de l'UIC de Nantes : Analyse « 5M » des éléments du processus	55
Conclusion.....	74
Annexes	77
Bibliographie	84

Liste des figures

Figure 1: Les compartiments de l'hématopoïèse [15].....	11
Figure 2 : cuves de conservation en azote liquide.....	12
Figure 3 : Cinétique de reconstitution immunitaire post-allogreffe de CSH et complications associées et complications associées [21]	16
Figure 4: Exemple de restauration de l'activité CTL anti-CMV après allogreffe de CSH [23].	18
Figure 5: Interaction des CTL sur une cellule présentant l'antigène cible [28]	19
Figure 6 : Activation des CTL [28].....	20
Figure 7 : Exemple de cinétique de réponse virologique au traitement par CTL spécifique du pp65 [5]. Virémie CMV et concentration en CTL activées en fonction du temps.	22
Figure 8 : Stratégies d'immunothérapie adoptive [33]	23
Figure 9 : Schéma de sélection immunomagnétique de cellules [45]	26
Figure 10 : Principe de l'isolation immunomagnétique par tétramère [48].....	28
Figure 11 : principe du marquage cellulaire après activation pour une sélection immunomagnétique liée à la sécrétion d'une cytokine [47]	31
Figure 12 : Contrôle par cytométrie de flux de l'isolement des lymphocytes actives [47]	32
Figure 13 : Schéma de la structure du cytomégalovirus [58].....	34
Figure 14 : Physiopathologie de l'infection à cytomégalovirus [59]	35
Figure 15 : Mode d'action des antiviraux dirigés contre l'ADN polymérase du CMV [61]	38
Figure 16 : Diagramme de causes et effets 5M.....	55
Figure 17: Principales étapes de production de lymphocytes T anti-CMV par sélection immunomagnétique	64
Figure 18 : Place du procédé dans le circuit de thérapie cellulaire de Nantes	76

Liste des tableaux

Tableau 1: Présentation des différentes sources de CSH	14
Tableau 2 : Production de CTL anti-virus par sélection immunomagnétique lié à la sécrétion d'IFN γ : virus cible et source d'antigène	33
Tableau 3: Présentation de l'analyse SWOT.....	40
Tableau 4 : Essais cliniques ayant utilisées des lymphocytes T anti-CMV après allogreffe de CSH.	42
Tableau 5 : Synthèse des traitements antiviraux utilisés contre le CMV:.....	77
Tableau 6 : Matières premières process	78
Tableau 7 : Matériel process	80
Tableau 8 : Contrôles du donneur	81
Tableau 9 : Contrôles du receveur.....	81
Tableau 10 : publications présentant l'utilisation de la colonne de séparation magnétique CliniMacs (Miltenyi Biotec) pour la production de différents types de CTL. Antigènes, temps de contact pour l'activation et milieux de cultures utilisés	82
Tableau 11 : Contrôle qualité du prélèvement :	83
Tableau 12 : Contrôle qualité in process	83
Tableau 13 : Contrôle qualité du produit fini	83

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'Etablissement Français du Sang de Nantes avec lesquelles j'ai pu échanger : unité d'ingénierie cellulaire, laboratoire de contrôle biologique, laboratoire de recherche... Les différents points techniques ont été largement discutés avec l'équipe de l'UIC. Cet échange m'a permis d'affiner le processus, et de me rendre compte plus rapidement des points critiques en thérapie cellulaire. Ces échanges ont permis de montrer aux futurs acteurs le procédé de production qui pourrait être mis en place à l'EFS. Ils ont également permis de soulever un certains nombre de questions, permettant ainsi de faire avancer le projet.

Je remercie plus particulièrement l'équipe technique de l'Unité d'Ingénierie Cellulaire de Nantes pour son accueil chaleureux. Merci donc à Fabienne, Sandrine, Evelyne, Claude et Pierre pour leur disponibilité et les connaissances qu'ils ont su me transmettre. J'ai pu grâce à leurs explications précises m'appuyer sur les procédures et modes opératoires internes de l'EFS de Nantes.

Ce projet étant également en partenariat avec l'Institut de Recherche Thérapeutique (IRT), il a également été débattu avec l'équipe d'Henry Vié. Cette Unité INSERM 892 du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers a pour objectif de tester et d'optimiser la production des CTL présenté par la suite.

Egalement un grand merci à Frédéric Dehaut et Sophie Derenne de m'avoir fait confiance en me proposant ce stage d'externat au sein de l'UIC et en me laissant une grande autonomie sur un projet passionnant.

Merci Frédéric d'avoir renouvelé cette confiance en me proposant de prolonger l'aventure avec cette thèse. Ton dynamisme et la pertinence de tes remarques m'ont donné l'envie d'atteindre l'objectif.

Merci au Professeur Jean-Marie d'avoir accepté la présidence de soutenance de ma thèse.

Une pensée à mon binôme, ancien colocataire et ami, Dr Marc Chauvet, sans qui j'aurais pu passer à côté des études de Pharmacie.

A mes parents, toujours là pour me soutenir et m'encourager, encore plus pour cette thèse.

Merci à Chrystelle pour le prêt de son ordinateur, sa patience à toute épreuve durant la rédaction de cette thèse et tout l'amour qu'elle me donne depuis plus de 7 ans.

Introduction

Les traitements utilisés contre les cancers (radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie) ont pour objectif premier de détruire les cellules cancéreuses, mais ont pour inconvénient de détruire également d'autres types de cellules normales. La moelle osseuse et les cellules issues de celle-ci, peuvent être détruites au cours de ce type de traitement. Les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) permettent de remplacer ces cellules endommagées : elles sont dotées de propriétés d'auto-renouvellement et capables de régénérer toutes les lignées hématopoïétiques (Figure 1: Les compartiments de l'hématopoïèse).

Dans le cas de pathologies hématologiques, ces greffes de CSH apportent en plus un effet bénéfique appelé *Graft versus Leukemia* (GvL), c'est-à-dire la capacité de contribuer à détruire les cellules cancéreuses en complément du traitement utilisé [1]. C'est pourquoi ce type de greffe est notamment utilisé comme thérapie cellulaire, depuis les années 1960, pour traiter plusieurs types de maladies du sang : leucémie, lymphome... Les greffes de CSH ont alors pour but de remplacer les cellules sanguines à l'origine de ces hémopathies. Entre 2000 et 2009, les greffes de CSH ont doublé en France, pour atteindre plus de 1 500 allogreffes par an [2].

Ces greffes entraînent cependant certaines complications majeures dont la maladie de greffon contre l'hôte ou *Graft versus host disease* (GvHD) [1], ou encore les infections post-greffes [3]. En effet, pour permettre la greffe, la moelle osseuse malade doit être détruite par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Elle ne produit alors plus de cellules sanguines, notamment les leucocytes, indispensables barrières aux agressions de l'environnement intérieur et extérieur au corps. Le patient est à ce moment à haut risque infectieux : bactéries et virus peuvent facilement s'attaquer à son organisme affaibli en défense immunitaire.

Les infections latentes présentes dans le corps avant la greffe, et les agents infectieux apportés par le greffon sont ainsi au premier rang des causes de complications. On peut citer des virus tels que le Cytomégalovirus (CMV), l'Epstein Barr Virus (EBV), ou le virus de la varicelle (VZV) qui, présents chez le patient ou le greffon, trouvent alors un terrain favorable à leur développement. D'autant plus favorable que la reconstitution immunitaire est lente : de 6 à 9 mois selon les différents constituants pris en compte [3] [4].

Ces infections virales opportunistes sont principalement traitées par des médicaments antiviraux. Les virus subissant régulièrement des mutations, ils acquièrent des résistances plus ou moins importantes au traitement[5]. Le virus échappe alors à tout contrôle et peut entraîner de graves complications, pouvant aller jusqu'à la mort du patient [3]. Les maladies à CMV sont donc associées à une mortalité importante [4]. Les symptômes cliniques digestifs et pulmonaires sont également très graves et de mauvais pronostic [3] [4]. Ceci est principalement lié à deux phénomènes distincts. Tout d'abord ces virus se révèlent souvent réfractaires aux traitements antiviraux communément utilisés (en plus d'une toxicité intrinsèque au traitement médicamenteux). Ensuite, lors des greffes de CSH, l'immunité adoptive met un certain temps à retrouver un niveau suffisant pour lutter contre ces infections [3].

Une des causes de la réactivation/prolifération des virus post-greffe est l'absence de lymphocytes T cytotoxiques spécifique du virus, ou « Cytotoxic T Lymphocytes» (CTL). L'injection aux patients de CTL dirigés contre le virus impliqué représente aussi une voie possible de traitement de ces infections opportunistes [5] [6]. On parle ici d'immunothérapie adoptive. Les patients greffés en CSH reçoivent cette injection de cellules spécifiques soit en prévention, soit pour traiter une infection détectée suite à la greffe. Ces cellules vont accélérer la restauration de l'immunité antivirale spécifique dirigée contre ce virus [7]. Ce transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques peut également reconstituer momentanément l'immunité virale après greffe de CSH et protéger des complications engendrées par ce pathogène [6]. Des premières preuves d'efficacité ont été obtenues en essais clinique pour des patients ayant reçu ce type de traitement [5] [6] [8].

L'objectif principal de cette thèse est de présenter un processus de production de CTL anti-CMV, compatible avec les principes des « Bonnes Pratiques de Fabrication » de l'industrie pharmaceutique [9], et transposable à l'Unité d'Ingénierie Cellulaire (UIC) de Nantes. Elle présente également la place de ce traitement dans l'arsenal thérapeutique contre le CMV. La finalité clinique est le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) anti-CMV pour le traitement et la prévention de la maladie à cytomégalo virus après greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Cette thèse rassemble donc différents éléments nécessaires à la mise en place du processus de production de lymphocytes T anti-CMV au sein de l'UIC, unité de l'Etablissement Français du Sang (EFS) sur le site de Nantes. Le but étant d'atteindre dans un premier temps un niveau de qualité conforme aux Bonnes Pratiques de Thérapies Cellulaires (BPTC) [10].

La première partie présente une revue bibliographique des éléments importants intervenant dans le cadre de cette thérapie cellulaire adoptive : la greffe de CSH, les CTL et le CMV.

La seconde partie présente une analyse de la place du transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) anti-virus dans le traitement et la prévention de complications après greffe de CSH. Cette analyse est réalisée à travers une matrice type « SWOT » (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*, pour Forces, Faiblesses, Menaces et Opportunités) comme outil décisionnel de l'intérêt à développer de cette stratégie thérapeutique.

La troisième partie présente une méthode de production permettant une stimulation et une sélection rapide de CTL anti-CMV. Cette méthode est analysée via une matrice « 5M » (Méthodes, Matières, Matériel, Milieu, Main d'œuvre) pour son application au sein de l'UIC de Nantes.

1. Revue Bibliographique

1.1. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Ces cellules responsables de l'hématopoïèse sont dotées de propriétés d'auto-renouvellement et capables de générer toutes les lignées hématopoïétiques (Figure 1: Les compartiments de l'hématopoïèse [15]). Elles permettent donc de fournir continuellement, après différenciation, les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Les greffes de CSH ont donc pour but de remplacer les cellules CSH du patient. Les leucémies ou les lymphomes, mais aussi d'autres formes de pathologies sanguines moins connues, peuvent ainsi être soignées. L'activité de greffe de CSH a plus que doublé entre 2000 et 2009 en France [2]. Plus de 1500 patients bénéficient ainsi chaque année de ce traitement en France.

1.1.1. Caractéristiques des CSH

1.1.1.1. Localisation des CSH

Les CSH sont principalement présentes dans la moelle osseuse, particulièrement dans les os courts et plats (côtes, sternum, os iliaques...) [11] [12]. Elles se retrouvent également dans le sang de cordon [13].

Une infime partie des CSH se retrouve dans la circulation générale. A l'aide de traitements adaptés, leur concentration augmente dans le sang périphérique et les CSH peuvent alors y être prélevées directement. Les médicaments suivant peuvent être utilisés:

- G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor) Neupogen® ou Granocyte® : Facteur de croissance hématopoïétique, permettant la mobilisation des CSH dans le sang périphérique.
- Mozobil ® : Plerixafor, immunostimulant antagoniste réversible des récepteurs CXCR4, il inhibe la fixation de chemokine, entraînant la perte de signal de fixation des CSH dans la moelle osseuse. Il est utilisé en combinaison avec le G-CSF pour augmenter le pourcentage de personnes répondant au G-CSF.

1.1.1.2. Différenciation

Les CSH sont des cellules de la moelle osseuse indifférenciées qui peuvent être à l'origine de tout type de cellules des lignées de cellules sanguines (Figure 1). Sous l'influence de facteurs de croissance et de différenciation, ces cellules vont se différencier en progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes. Elles s'engagent ensuite vers une différenciation plus engagée pour devenir des précurseurs des différentes lignées. Elles continuent leur maturation et se divisent finalement pour donner naissance aux cellules matures.

Les progéniteurs sont également intéressants car ils sont présents en plus grand nombre que les CSH dans les greffons. Ils permettent un renouvellement rapide des cellules de la lignée pour laquelle ils sont engagés. Le dosage de ces « Colony Forming Unit » (CFU) est un bon indicateur de la qualité du prélèvement et de la future greffe [14].

Les CFU-GM, à l'origine des monocytes et des polynucléaires neutrophiles, sont par exemple utilisés pour le suivi de la qualité du greffon.

1.1.1.3. Auto-renouvellement

La deuxième propriété importante des CSH est leur capacité d'auto-renouvellement. Elles peuvent se multiplier sans se différencier et rester donc en quantité suffisante pour assurer l'hématopoïèse. Elles sont cependant pour la plupart en phase G0 et donc en dehors du cycle cellulaire. L'équilibre complexe entre auto-renouvellement et différenciation permet un maintien des propriétés de la moelle osseuse que constituent les cellules sanguines.

Les différents compartiments et stade de différenciation de l'hématopoïèse sont résumés sur le schéma ci-dessous, avec en vert les CSH :

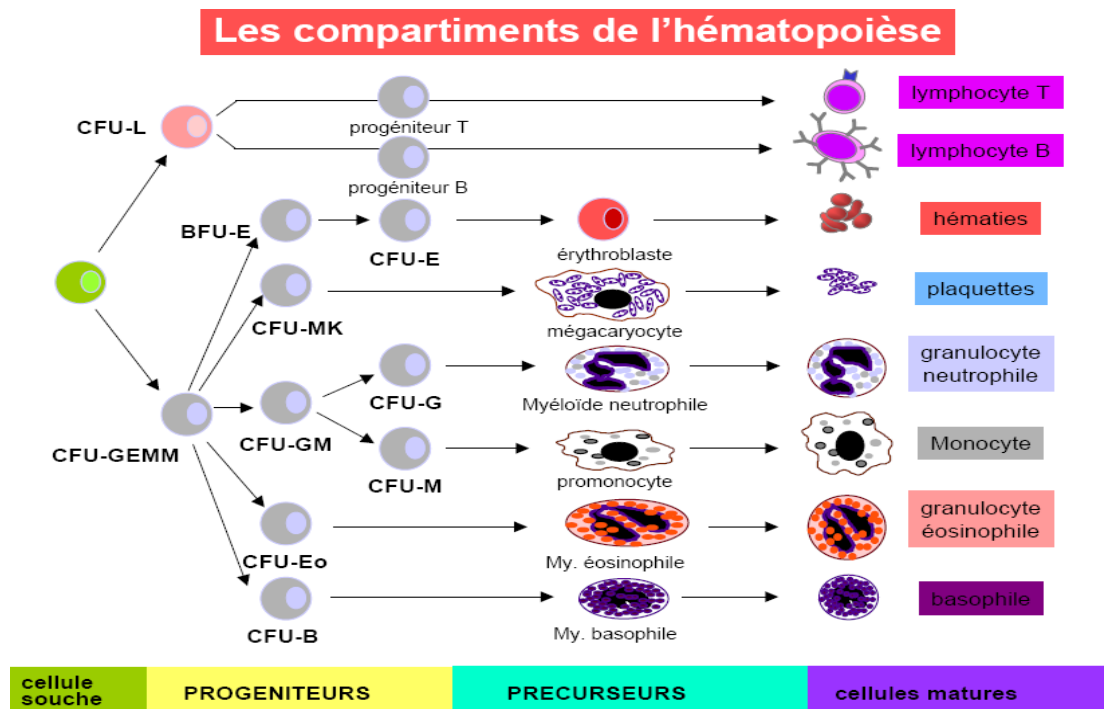


Figure 1: Les compartiments de l'hématopoïèse [15]

1.1.1.4. Marqueurs cellulaires :

Les CSH possèdent les caractéristiques suivantes concernant les marqueurs immunologiques [11] [12] :

- CD34+ : présence du marqueur CD34 ayant pour fonction l'adhésion cellulaire, notamment pour l'attachement des CSH à la matrice extracellulaire de la moelle osseuse.
- Thy1+ (ou CD90+): présence du marqueur Thy1
- CD33 - : absence du marqueur CD33 de la lignée myéloïde (et absence des autres marqueurs de restriction de lignées).

1.1.1.5. Cryopréservation :

Une autre qualité intéressante est la conservation de leur propriétés après congélation à -196°C et décongélation après des mois/années. Les prélèvements excédentaires des greffes peuvent ainsi être conservés dans de l'azote liquide, comme ce qui est fait actuellement à l'UIC [11] [16].



Figure 2 : cuves de conservation en azote liquide

1.1.2. Les greffes de CSH

1.1.2.1. Indications

La greffe de CSH est devenue le traitement de référence pour de nombreuses maladies congénitales ou acquises du système sanguin.

Ces produits de thérapies cellulaires ont pour indications principales les maladies lymphoprolifératives, et les leucémies [17] [3]. Les hémopathies malignes le plus souvent soignées par ces thérapeutiques sont des leucémies aiguës myéloïdes ou lymphoïdes, des lymphomes (Hodgkiniens et non Hodgkiniens) et myélome multiple.

Pour les greffes autologues, la réinjection des greffons de CSH permet de reconstituer le tissu hématopoïétique après une irradiation corporelle totale par radiothérapie et/ou après une chimiothérapie intensive. La sortie d'aplasie est ainsi plus rapide.

Les greffes allogéniques de CSH permettent de remplacer les CSH du receveur, avec dans un premier temps un effet *Graft versus Host* (GvH, greffe contre l'hôte). Puis les greffons vont engendrer une destruction des cellules cancéreuses. Il s'agit de l'effet *Graft versus Leukemia* (GvL) (action immunitaire du greffon contre les cellules tumorales) [1]. Cette transplantation aboutit au remplacement progressif du système immunitaire du receveur par celui du donneur.

Il existe d'autres indications. Par exemple, elles peuvent aussi être utilisées pour apporter un élément manquant au tissu hématopoïétique (aplasie médullaire), un déficit immunitaire primitif, une anomalie de l'hématopoïèse... La thérapie cellulaire a dans ce sens des perspectives de développement importantes.

1.1.2.2. Origine des greffons

Le greffon peut provenir du malade ou d'un donneur autre que le malade. On parle respectivement d'autogreffe et d'allogreffe de CSH [18]. En termes de compatibilité HLA, il est plus simple de réaliser une autogreffe. Cependant, suivant les pathologies, une allogreffe peut s'avérer obligatoire. Pour limiter les risques d'incompatibilités, les allogreffes provenant de parents sont privilégiés. En l'absence de compatibilité HLA, une demande d'allogreffe provenant d'un donneur non apparenté sera réalisée.

Les greffons de CSH peuvent provenir de trois sources de prélèvements différentes, présentées dans le tableau suivant [19]:

<i>Source</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
Moelle osseuse (MO)	Prélèvement au niveau des crêtes iliaques du bassin sous anesthésie générale.	Permet également le recueil de l'environnement cellulaire spécifique de la moelle osseuse.	Risques liés à l'anesthésie générale ; hospitalisation du patient durant 2 jours.
Sang périphérique: CSH périphériques (CSHP)	Prélèvement par cytophérèse, après conditionnement du donneur par traitement spécifique (Endoxan®, G-CSF, Mozobil®)	Prélèvement aisé en 2 à 4 heures, sans anesthésie.	Stimulation par des facteurs de croissance.
Sang placentaire (ou unité de sang placentaire (USP))	A partir de cordon ombilical, très riche en cellules immatures.	Compatibilité HLA avec le donneur peut être moins importante Possibilité de greffer des adultes grâce à l'utilisation de 2 cordons.	Durée d'aplasie reste plus longue car composition en cellules moins importante.

Tableau 1: Présentation des différentes sources de CSH

L'utilisation de moelle osseuse est en net recul, du fait de l'obtention plus aisée de CSH périphérique ou de sang placentaire. L'avenir se tourne maintenant vers l'expansion cellulaire de CSH, notamment à partir de sang de cordon [20].

1.1.2.3. La greffe

Afin de recevoir la greffe, le receveur est « conditionné » par chimiothérapie et/ou radiothérapie. L'objectif est de détruire la moelle osseuse malade. Son système immunitaire est donc alors quasiment détruit. Le patient peut alors recevoir les CSH.

Vingt-quatre à quarante-huit heures après la fin de la préparation du receveur, le greffon de moelle osseuse prélevé au donneur est transfusé au malade. Il ne s'agit pas d'un acte chirurgical, les cellules du greffon sont en effet injectées par voie intraveineuse. Les cellules vont spontanément s'implanter dans les os du malade, pour progressivement reconstituer tout le tissu de la moelle osseuse (phénomène de *Homing*) [1] et permettre la reprise de production des différentes cellules sanguines.

En général, le malade reste hospitalisé environ un mois après la greffe. Il présente généralement une période d'aplasie (faible nombre de cellules sanguines dont les globules blancs qui provoque une vulnérabilité aux problèmes infectieux) durant laquelle la moelle osseuse n'est pas complètement fonctionnelle (Figure 3). Pendant cette phase, le malade est isolé dans un environnement protégé. Lorsque la moelle osseuse greffée est suffisamment fonctionnelle, le malade peut alors quitter l'hôpital tout en faisant l'objet d'une surveillance médicale étroite jusqu'au 100^{ème} jour après la greffe et plus si nécessaire.

En plus de remplacer la moelle osseuse défectueuse du malade, le greffon va également s'attaquer aux cellules cancéreuses non détruites lors de la thérapie précédant la greffe. On parle alors de phénomène de greffe contre la leucémie (GvL) [1]. Si le phénomène s'amplifie aux autres cellules du receveur, on parle de réaction de greffe contre l'hôte (GvH).

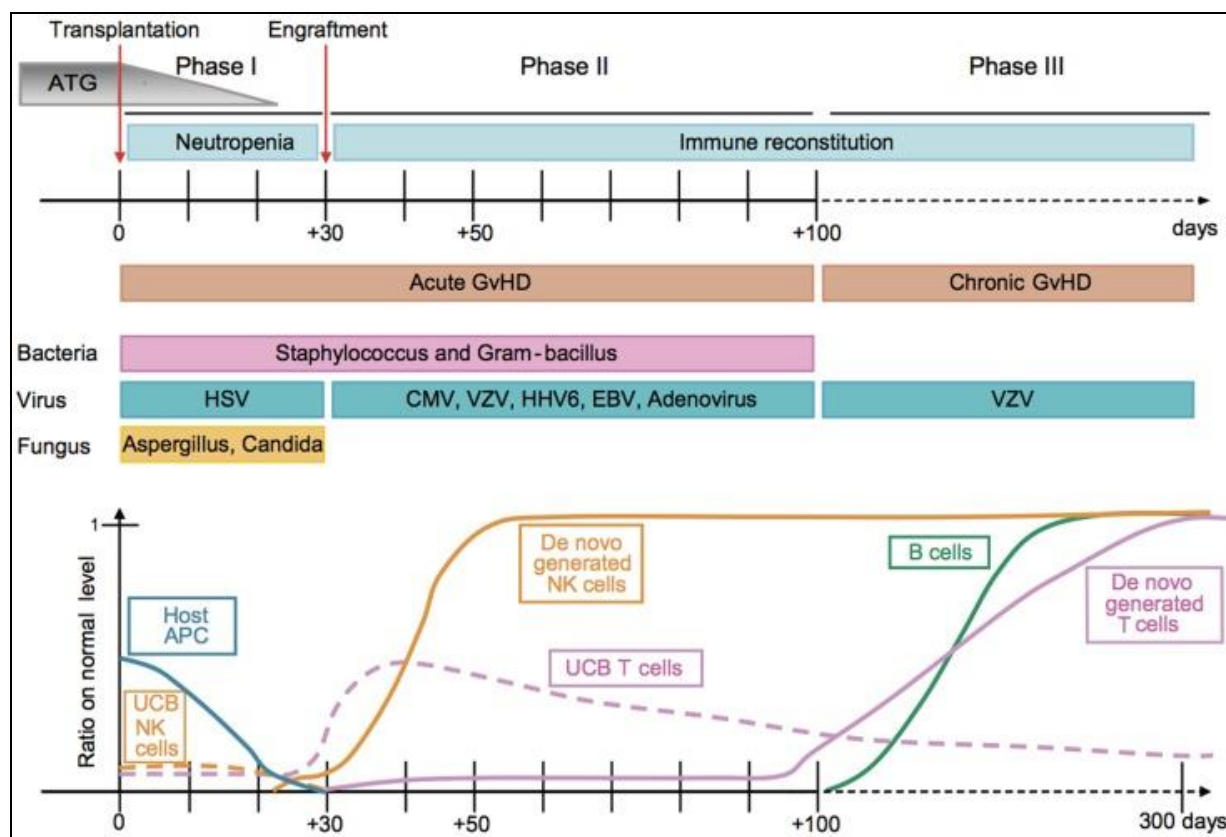


Figure 3 : Cinétique de reconstitution immunitaire post-allogreffe de CSH et complications associées et complications associées [21]

1.1.2.4. Complications post-greffe

1.1.2.4.1. Le rejet

Comme pour tout type de greffe, le greffon peut dans un premier temps être rejeté par le système immunitaire du receveur.

1.1.2.4.2. La réaction du greffon contre l'hôte (GvH)

Après allogreffe de CSH, on peut observer une réaction spécifique à ce type de greffe. En effet, ce n'est plus le receveur qui rejette la greffe comme expliqué précédemment, mais le greffon qui s'attaque au receveur. C'est l'effet GvH. GvL et GvH sont en fait deux aspects d'un même mécanisme [1]. L'effet bénéfique GvL (Graft versus Leukemia) s'attaque aux cellules malades de la moelle osseuse de l'hôte. Cependant, au lieu de détruire uniquement les cellules cancéreuses, la réaction peut s'étendre à l'ensemble des cellules du patient, créant la GvH.

1.1.2.4.3. Les infections post-greffes

Le dernier type de complication après greffe de CSH sont les infections post-greffes [3]. En effet, pour permettre la greffe, la moelle osseuse malade doit être détruite par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Elle ne produit alors plus de cellules sanguines, notamment les leucocytes, indispensables barrières aux agressions de l'environnement intérieur et extérieur au corps. Le patient est à ce moment à haut risque infectieux : bactéries et virus peuvent facilement s'attaquer à son organisme affaibli en défense immunitaire (Figure 3)

La réactivation virale est également une problématique importante dans d'autres cas de greffes. C'est notamment le cas après greffe de poumon [21], de cœur, de foie ou de rein [7] où les cas de maladie de à CMV sont de très mauvais pronostic.

1.1.2.4.4. Conséquences sur la maladie à CMV

Les maladies à CMV sont la cause majeure de mortalité et de morbidité après allogreffes de CSH [3] [4]. 60 à 70 % des patients séropositifs avant greffes allogéniques ou recevant une greffe d'un donneur séropositif sont susceptibles de présenter une infection à CMV [3] [22]. Le pic d'infection se situe trois mois après la greffe. Les travaux de plusieurs équipes mettent en évidence un lien entre la maladie à CMV et la cinétique de reconstitution immunitaire post-greffe. C'est le retour de la réponse cytotoxique immunitaire qui confère la protection contre la maladie [5] [23]. Les patients recouvrant trop tardivement cette immunité sont plus sujets à la survenue de pneumopathie à CMV. Cette corrélation a dans un premier temps été présentée dans un modèle murin de la maladie à CMV [24], puis sur des patients allogreffés (Figure 4) :

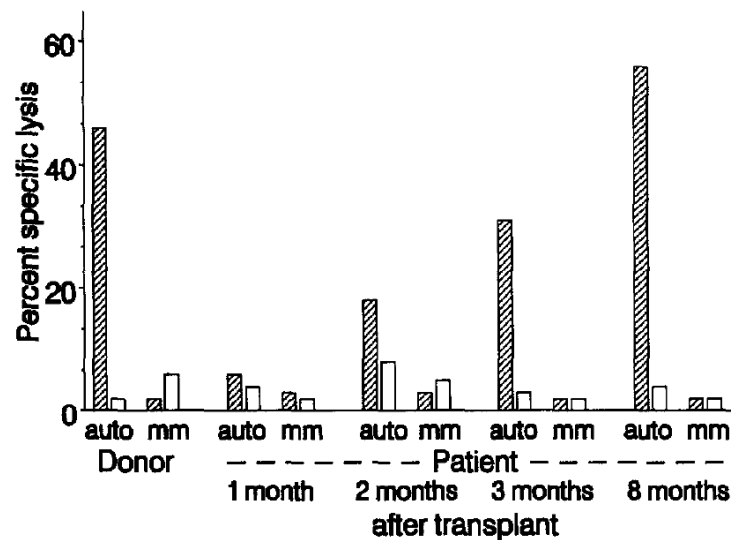


Figure 4: Exemple de restauration de l'activité CTL anti-CMV après allogreffe de CSH [23].

Cet exemple de reconstitution chez un patient allogreffé en CSH montre une restauration de l'immunité contre le CMV après 3 mois comparable à l'immunité initiale chez le donneur. Cet exemple met également en évidence l'importance de la correspondance HLA pour obtenir une activité cellulaire contre le CMV. Le pourcentage de cytotoxicité est testé sur cellule autologue (auto) et avec mismatch HLA (mm). En rayé sur des cellules infectés par le CMV et blanc sur des cellules non infectés par CMV [5] [23].

1.2. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) :

1.2.1. Propriétés

Les CTL sont des lymphocytes T qui ont la capacité d'entraîner la destruction des cellules (cytotoxiques) présentant l'antigène spécifique contre lequel ces CTL se sont différenciés.

Cette activité cytotoxique est possible grâce à la présence à leur surface de récepteurs, TCR (pour T cell receptor), pouvant se lier à des complexes formés par le peptide cible (antigène) présenté par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I de la cellule cible [25]. La surface de la plupart des CTL possède également la protéine CD8, qui est attirée vers des portions de la molécule de classe I CMH. Cette affinité entraîne une liaison étroite entre CTL et sa cellule-cible lors de l'activation antigène-spécifique.

Une fois fixée par le complexe CMH-antigène spécifique, les CTL libèrent la Perforine, une protéine qui produit des pores dans la membrane plasmique des cellules-cibles et provoque leur lyse [26]. Les CTL libèrent également le granzyme, une protéase à sérine, capable de pénétrer dans la cible par les pores occasionnés par la perforine et induire une apoptose (mort cellulaire) en détruisant les protéines présentes dans la cellule [27].

Un autre produit libéré par les CTL est l'interféron gamma ($\text{IFN}\gamma$). Cette cytokine augmente la présentation des antigènes par les molécules du CMH et amplifie donc l'activation des CTL. Elle va également activer d'autres cellules immunitaires, comme les macrophages, permettant la destruction de cellules infectées par des virus ou bactéries [26].

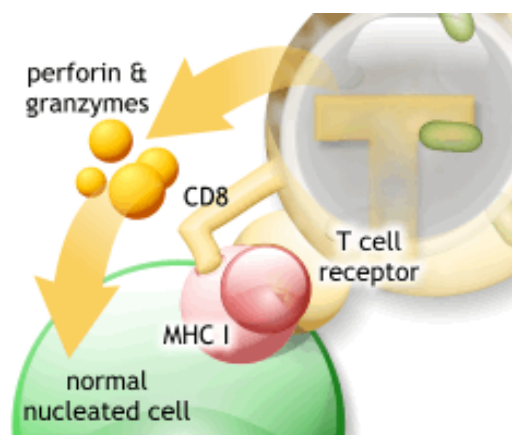


Figure 5: Interaction des CTL sur une cellule présentant l'antigène cible [28]

1.2.2. Activation in-vivo

Les CTL sont activés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes B activés ou les macrophages via l'interaction TCR/antigène/CMH I [27].

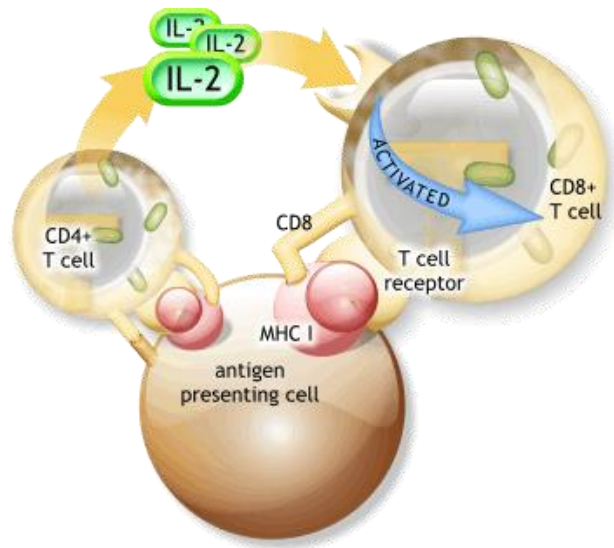


Figure 6 : Activation des CTL [28]

Pour accélérer l'activation des CTL, une autre population de lymphocytes T participe à ce processus : la sous-population CD4+. Elle correspond aux lymphocytes T helper qui aident à l'activation des CTL en libérant des interleukines, comme l'interleukine 2 (IL-2) [26]. Cette population est activée par le complexe formé entre le TCR présent à leur surface et CMH de classe II couplé à l'antigène présent sur les CPA. Ces cellules une fois activées sécrètent également de l'IFN γ . CTL et LT helper présentent également à leur surface cellulaire le marqueur CD45, comme tous les leucocytes.

1.2.3. Utilisation des CTL en thérapeutique : immunothérapie adoptive

« L'immunothérapie adoptive consiste à administrer à un patient une source de lymphocytes T reconnaissant un antigène (viral ou tumoral) exprimé par des cellules à éliminer et capables d'exercer une activité protectrice ». Cette définition de l'immunothérapie adoptive proposée par Cerottini *et al.* en 2000 permet de comprendre rapidement le fonctionnement, l'intérêt et les perspectives des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) utilisés dans cette approche de thérapie cellulaire [22].

Ainsi, les deux principales applications de ce transfert concernent la restauration de l'immunité antivirale [29] et l'amplification des réponses anti-tumorales [30].

Ce transfert est soit autologue, soit entre donneur et receveur compatible car l'activation des CTL est fortement liée à la présentation par le CMH comme expliqué précédemment [22].

1.2.3.1. CTL anti-CMV

Les CTL anti-CMV participent à la régulation de l'infection par ce virus. Plusieurs études ont montré l'importance de ces cellules spécifiques pour la reconstitution immunitaire post-transplantation de CSH [24]. Ceci a notamment été mis en évidence par les greffes provenant d'un patient séronégatif pour ce virus. La greffe ne contient alors aucun CTL spécifique à transmettre au receveur. En cas d'infection ou de réactivation (cf.

Figure 14), le patient ne dispose donc pas de suite de cette arme efficace pour combattre le virus et le risque de maladie à CMV est augmenté [31].

Nous présentons ici une stratégie thérapeutique à base de CTL anti-CMV. L'objectif est de restaurer le répertoire d'immunité cellulaire dirigé contre le CMV en injectant aux patients des lymphocytes T spécifiques de ce virus. Cette stratégie a été proposée pour la première fois en 1991. Onze patients ont alors montré une réponse équivalente à celle observée chez le donneur [32]. Le concept de transfert adoptif de CTL anti-CMV est alors validé.

Sur la Figure 7 ci-dessous, présentant un exemple de cinétique virologique à CMV chez un patient avant et après injection de CTL, on peut noter les 3 phases successives suivantes :

- dans un premier temps, en l'absence de CTL (CD8+) et LT helper (CD4+), la concentration en CMV augmente fortement.
- après injection de CTL, une forte diminution de cette concentration, inversée par rapport à la concentration en CD4+ et CD8+. Une fois le CMV diminué, le pourcentage de cellules dirigées contre le CMV diminue, sans atteindre être nul, c'est la mémoire immunitaire.

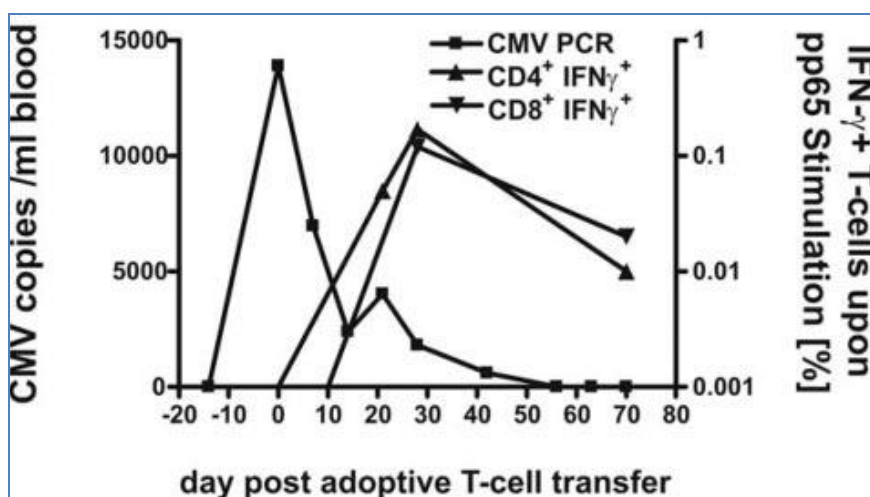


Figure 7 : Exemple de cinétique de réponse virologique au traitement par CTL spécifique du pp65 [5].
Virémie CMV et concentration en CTL activées en fonction du temps.

La production et les épitopes visés du virus varient d'une équipe à l'autre (Tableau 10) et rendent difficiles les méta-analyses sur l'activité réelle de ces nouveaux traitements de thérapie cellulaire. Ils sont une alternative possible aux antiviraux, lorsque ceux-ci deviennent inefficaces. L'efficacité, l'absence de toxicité du traitement et la survie des CTL injectés a été validé par différentes équipes (Tableau 10). Des essais plus récents à base de CTL dirigés contre des épitopes spécifiques du CMV (pp65 et/ou IE1) ont également permis d'obtenir une diminution de la virémie ainsi qu'une activité anti-CMV conservée plusieurs mois après injection [5]. Ces résultats valident l'hypothèse que des CTL dirigés contre un seul épitope antigénique comme le pp65 peuvent suffire à empêcher la survenue de maladie à CMV. C'est la méthode qui sera présentée dans cette thèse.

1.2.4. Production de CTL à visée thérapeutique

Trois stratégies principales d'obtention de CTL anti-CMV peuvent être utilisées pour la production d'un traitement d'immunothérapie adoptive:

- Immunothérapie non spécifique : utilisation de DLI (Donor Lymphocyte infusion)
- Immunothérapie spécifique
 - Déplétion alloréactive : élimination des lymphocytes alloréactifs
 - Sélection de lymphocytes T spécifiques de la cible

Nous présenterons de manière plus poussée la sélection de CTL par méthode immunomagnétique, mode de production présenté par la suite dans cette thèse.

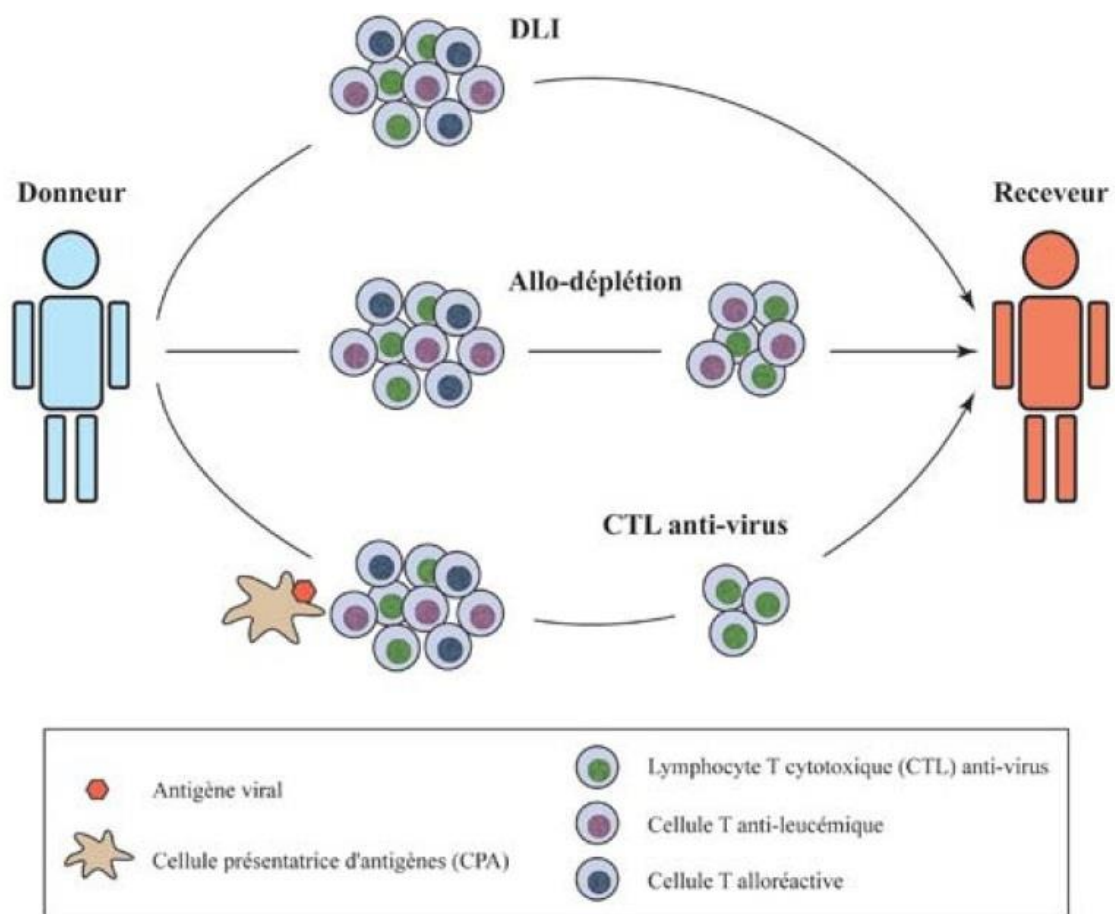


Figure 8 : Stratégies d'immunothérapie adoptive [33]

1.2.4.1. DLI

Les DLI sont obtenus par prélèvement de cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC), mobilisé ou non par GCSF (granulocyte colony stimulating factor), provenant généralement du même donneur que la greffe de CSH [34]. L'injection de DLI aux patients a été une des premières immunothérapies adoptée pour les patients atteints d'infections post-greffe de CSH [35]. La majorité des études porte sur des infections à Adénovirus (ADV) [36] ou Epstein Barr virus (EBV) [37]. Les résultats de ces études sont relativement encourageants d'un point de vue anti-infectieux, par la présence de CTL dirigés contre ces virus. Cependant, comme le rappelle une étude testant les DLI contre le CMV [38], la présence de lymphocytes T allo-réactifs du donneur peut entraîner des GvHD graves. A certaines doses, ce phénomène serait limité et permettrait d'utiliser cette source de CTL de façon plus sûre [39]. Ce type de produit reste cependant toujours utilisé car il possède un potentiel important d'effet antileucémique (GvL) [22].

1.2.4.2. La déplétion allo-réactive

Afin de pallier au principal effet délétère des DLI qu'est la GvHD, il a ensuite été proposé d'extraire des DLI leurs effets allo-réactifs. Plusieurs méthodes d'allodéplétion sont possibles : extraction des lymphocytes allo-réactifs ou désactivation (anergie) [40]. Il est par exemple possible de réaliser cette extraction en mettant en contact en culture mixte lymphocytaire les cellules du donneur et les cellules du receveur irradiées. Après 3 jours de culture, un anticorps anti-chaîne γ du récepteur de l'IL2 (CD25) couplé à une immunotoxine est ajouté pendant toute une nuit, détruisant les cellules allo-réactives [41]. L'effet anti-infectieux est ainsi conservé [42] mais amoindri par ces manipulations diminuant la concentration en L_T .

1.2.4.3. Sélection spécifique

La troisième stratégie adoptée est la sélection spécifique de lymphocytes dirigés uniquement contre la cible souhaitée. L'objectif est donc de canaliser l'activité cellulaire contre un antigène spécifique.

Plusieurs stratégies de sélections spécifiques ont été envisagées, principalement la culture cellulaire et la sélection immunomagnétique.

1.2.4.3.1. Culture cellulaire

La culture cellulaire a pour objectif de cibler spécifiquement l'activation ou la réactivation des L_T dirigés contre l'antigène cible pendant une période de culture de plusieurs jours.

La première méthode consiste à réactiver des cellules prélevées chez un donneur CMV+. L'objectif est de réactiver uniquement les L_T spécifiques du virus au milieu de la population de L_T prélevées. Il est ensuite possible d'amplifier la multiplication des L_T spécifiques afin d'obtenir une quantité plus importante de cellules antivirus. Cette méthode a, par exemple, été utilisée en 2002 [43], en incubant pendant plusieurs jours un prélèvement avec du lysat de CMV. Les lymphocytes spécifiques du CMV prolifèrent et s'activent alors de façon importante. En l'injectant à 7 patients atteint de maladie à CMV post-greffe de CSH, 5 d'entre eux ont vu leur charge virale diminuer jusqu'à être non détectable. Une diminution a été mise en évidence pour les 2 autres patients. Une autre méthode de réactivation possible est la présentation aux PBMC prélevés de cellules présentant à leur surface l'antigène d'intérêt. L'équipe de Rooney a présenté en 2011 des résultats intéressants par cette méthode permettant même d'obtenir une activité dirigée contre plusieurs virus après avoir modifié la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA, des cellules dendritiques dans le cas de cette étude) [44]. Ces CPA présentent dans cette méthode à la fois des antigènes de CMV, d'EBV et d'ADV.

La deuxième possibilité en culture cellulaire est de partir de cellules « vierges », qui n'ont jamais été en contact avec le CMV pour créer une lignée de cellules *in vitro*. Il est par exemple possible de produire des CTL dirigés contre un virus spécifique en mettant en contact du sang de cordon séronégatif avec des cellules dendritiques chargés en antigène cible. Une étude menée en 2012 présente même la possibilité de fabriquer un produit dirigé contre plusieurs virus, dont le CMV, par cette méthode [13].

Le produit obtenu par culture cellulaire contient en majorité des L_T antivirus activés. Mais il contient également tout le répertoire L_T non spécifique du virus et peut donc contenir des L_T susceptibles de générer une alloréactivité. Les produits obtenus par cette méthode doivent donc être injectés à des patients avec un niveau de compatibilité HLA suffisant pour en garantir la sécurité, mais également l'efficacité. La stimulation à plusieurs reprises du répertoire L_T prélevés chez le donneur permet d'augmenter de façon importante la proportion de L_T spécifiques. Après 4 stimulations successives, certaines études mettent en évidence que le produit obtenu a perdu son alloréactivité contre le patient et a même pu être injecté chez un patient avec une incompatibilité de 3 antigènes HLA [43].

1.2.4.3.2. Sélection immunomagnétique

La sélection immunomagnétique est utilisée en recherche et en clinique pour isoler des cellules d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifique d'un ligand présent sur ces cellules. Sur la partie non spécifique de l'anticorps est fixée une microbille métallique qui va permettre de réaliser un tri magnétique : les cellules ayant fixé l'anticorps sont retenus par l'aimant utilisé et se retrouvent dans la fraction positive ; les autres cellules se retrouvent dans la fraction négative (Figure 9). La fraction d'intérêt peut être soit la fraction marquée par l'anticorps et l'on parle de sélection positive ; soit l'objectif est d'éliminer la fraction positive et conserver les cellules non marquées et il s'agit alors d'une sélection négative.

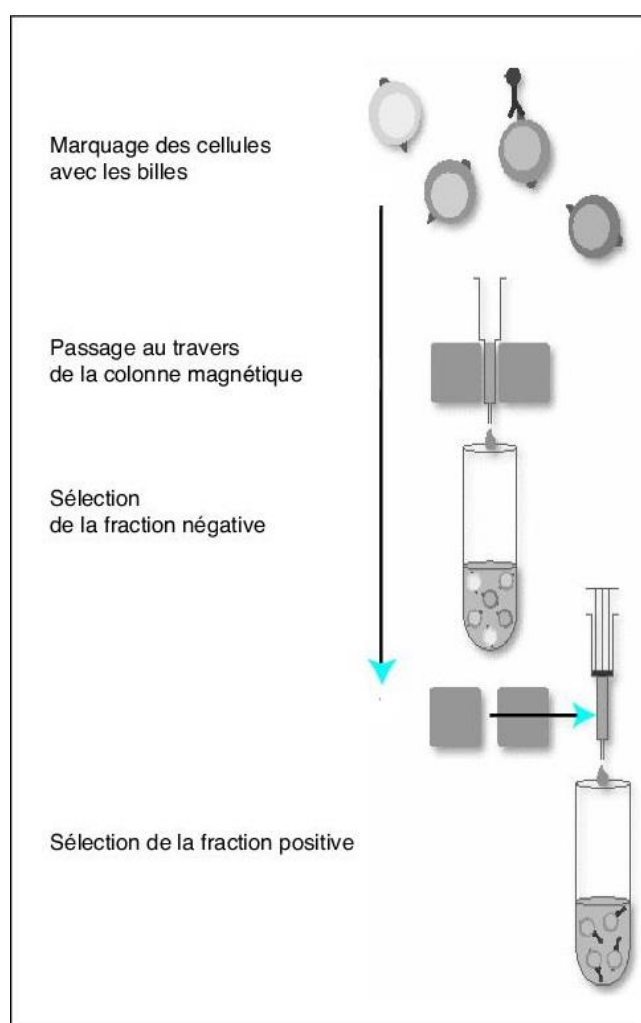


Figure 9 : Schéma de sélection immunomagnétique de cellules [45]

Cette technique a pour avantage de permettre l'isolation simple et rapide de cellules provenant directement d'échantillons non traités comme le sang ou la moelle osseuse. De plus, contrairement au tri par cytométrie en flux, il n'y a pas d'interférence avec les mouvements d'ions et la sélection d'une population de cellules viables en grande quantité est effectuée rapidement [45]. Il est à noter que sur la Figure 9, la sélection présentée est dite mono-paramétrique, car elle permet uniquement de trier selon un seul site de fixation d'anticorps. Les méthodes multiparamétriques permettent d'isoler une fraction présentant plusieurs marqueurs d'intérêts et ainsi isoler une fraction très rare. A cela peut également s'ajouter un tri cellulaire fonctionnel des cellules sécrétant des cytokines [46]. C'est une méthode mettant en jeu plusieurs anticorps et la sécrétion d'IFN γ par les cellules d'intérêt activées qui sera décrite plus précisément dans cette thèse pour l'obtention des lymphocytes T anti-CMV.

Actuellement, un système de sélection immunomagnétique possède le marquage CE et les réactifs certifiés pour usage clinique indispensable à la réalisation de produit de grade clinique par cette méthode : le système CliniMacs (Miltenyi Biotec) [47]. Nous présenterons donc par la suite des méthodes utilisant cet outil de sélection immunomagnétique qui peuvent être regroupées en 3 principales catégories [33]:

- Utilisation de tétramères présentant un peptide viral
- Sélection de L_T exprimant après stimulation par un antigène un marqueur de co-stimulation (CD137) ou un marqueur d'activation (CD154)
- Sélection des L_T sécrétant de l'IFN γ après stimulation par un antigène.

1.2.4.3.2.1. Utilisation de tétramères

Une des possibilités de ce système est l'utilisation de tétramères (biotinylés) HLA-restreints présentant un peptide viral et permettant de cibler les L_T spécifiques. Un anticorps anti-biotine couplé à une bille immunomagnétique permet alors de sélectionner les cellules d'intérêts [33]. Comme le présente la figure ci-dessous, quatre étapes distinctes vont permettre l'obtention des cellules d'intérêt [48] :

- Le réactif tétramérique va se coupler aux cellules d'intérêts via l'interaction du complexe CMH-antigène-TCR.
- Le prélèvement est ensuite passé sur colonne de séparation magnétique. Une solution de « lavage » entraîne les cellules non marquées. Les cellules fixées au tétramères sont retenues par fixation magnétique à la colonne composé d'un puissant aimant.
- Les cellules d'intérêt sont ensuite récupérées puis une solution contenant de la biotine est injectée et entraîne la dissociation du réactif par compétition de liaison.
- Le complexe CMH-antigène-TCR se détache ensuite spontanément. Les L_T d'intérêt sont isolés.

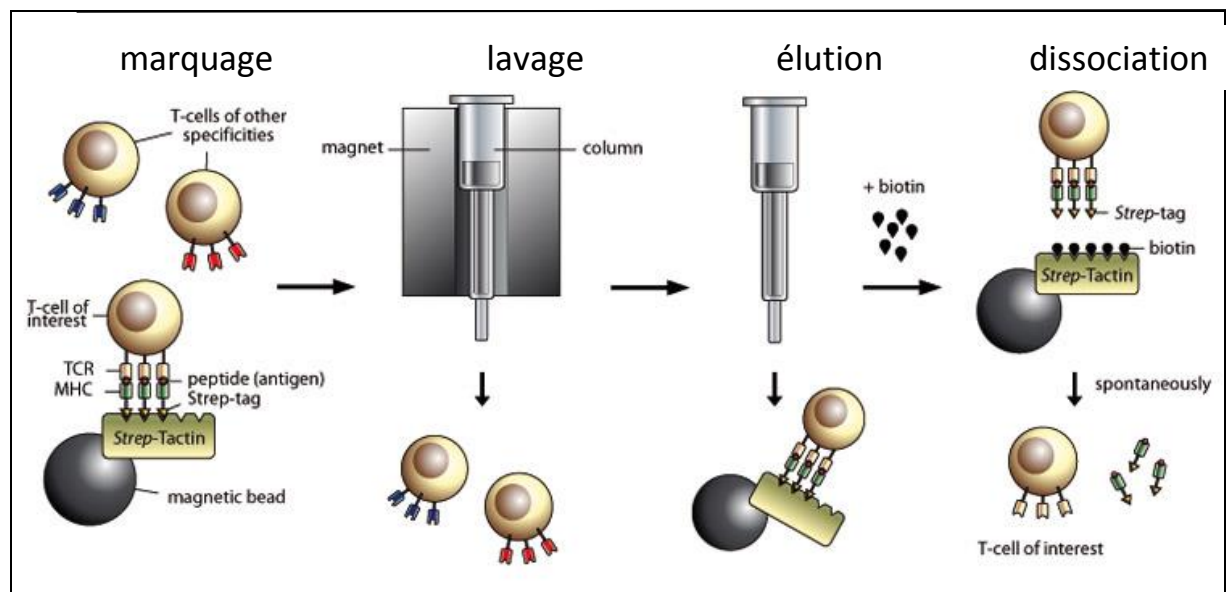


Figure 10 : Principe de l'isolation immunomagnétique par tétramère [48]

La technologie des tétramères permet d'isoler une population L_T CD4⁺ ou CD8⁺, mais ne peut simultanément sélectionner les deux populations. En effet, le tétramère comprend soit une molécule de CMH-I soit une molécule de CMH-II. On peut imaginer plusieurs manipulations successives pour l'obtention d'un répertoire plus large de L_T . Les méthodes publiées actuellement ne proposent que l'isolement pour une classe de CMH, le plus souvent le CMH-I car permettant d'isoler les CD8⁺ à l'origine de l'activité cytotoxique. Plusieurs études présentant la sélection uniquement du répertoire cytotoxique CD8⁺ par cette méthode à montrer des résultats encourageants. Une première étude a permis de négativer la charge virale en CMV sur l'ensemble des 10 patients traités [49]. Une seconde présente une charge en CD8⁺ qui se retrouve à long terme chez les patients [3]. De plus, le produit utilisé pour cette étude a été obtenu à l'aide de réactifs type *streptamer*® (de la société stage celltherapeutics) autorisés par les autorités réglementaires allemandes et anglaises à des fins cliniques.

1.2.4.3.2.2. CTL avec marqueurs cellulaires activés

Après activation, les lymphocytes T spécifiques des antigènes présentés dans le milieu expriment à leur surface le CD134. Cette spécificité a été utilisée en 2011 pour sélectionner un pool de L_T dirigé contre plusieurs virus (EBV, CMV, ADV et influenza) [50]. Une seconde équipe propose même de sélectionner un répertoire de lymphocytes dirigé contre des virus, mais également contre des pathogènes entraînant des infections fongiques comme *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus* [51]. La méthode présentée ici consiste également à mettre en contact le prélèvement avec des antigènes pendant une certaine période, suivi d'une sélection positive sur colonne CliniMacs. La différence se fait par le marqueur cellulaire visé qui est le CD154, autre élément présent à la surface des lymphocytes T après activation. Une autre publication en 2013 utilise cette méthode pour extraire uniquement le répertoire CMV spécifique [52].

Cette méthode a pour avantage de permettre une sélection de l'ensemble du répertoire activé, même pour plusieurs types de virus différents. Mais comme toutes les stratégies d'isolement de L_T dirigé contre plusieurs antigènes, cette méthode conduit à la prévalence de certains CTL et donc une activité plus faible contre les autres pathogènes cibles [33].

1.2.4.3.2.3. CTL sécrétant IFN γ

Les cytokines ont un rôle capital dans l'orientation de la réponse immunitaire effectrice. Des cellules ayant le même marqueur cellulaire peuvent sécréter des cytokines différentes. La dernière méthode présentée ici permet de récupérer des fractions enrichies en cellules sécrétant un type de cytokine. La cytokine d'intérêt est ici l'IFN γ , au centre de l'activité cytotoxique [50, p. 4].

Le principe consiste à utiliser un hybride composé de deux anticorps : l'un se liant à l'antigène CD45 présent et l'autre liant la cytokine recherchée [47]. L'ensemble des cellules possédant à leur surface ce marqueur cellulaire fixe l'anticorps : l'ensemble des leucocytes sont alors marqués par la partie CD45 spécifique de l'anticorps. Dans un second temps, les cellules sont activées en les mettant en présence de l'antigène d'intérêt. Les cellules ainsi activées vont alors sécréter les différentes cytokines, dont l'IFN γ , liées à leur activité. Les IFN γ sécrétés à proximité des cellules vont se fixer sur la deuxième portion de l'anticorps hybride. Ces cellules sécrétrices d'IFN γ sont ensuite récupérées en utilisant des billes marquées avec un anticorps anti-cytokine (Figure 11). Cette technique permet de sélectionner des populations de cellules représentant jusqu'à moins de 0,1 % de la totalité des cellules de départ [45].

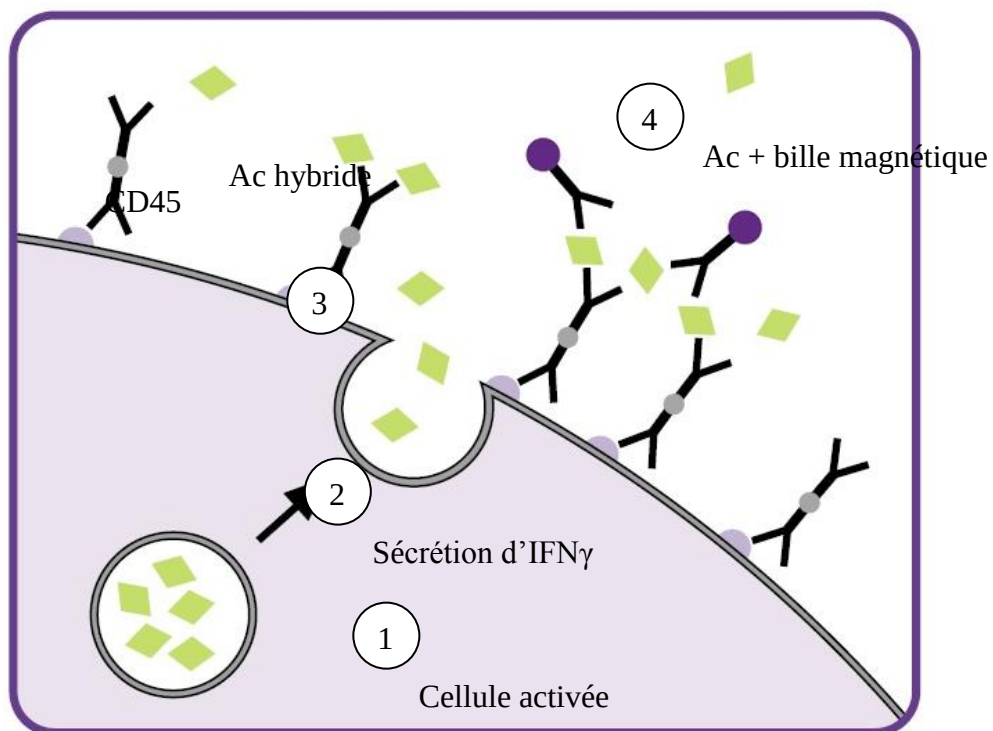


Figure 11 : principe du marquage cellulaire après activation pour une sélection immunomagnétique liée à la sécrétion d'une cytokine [47]

L'IFN γ joue un rôle clé dans l'activation cellulaire cytotoxique [50, p. 4]. Elle est sécrétée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8 + et helper CD4+ activés que l'on retrouve après analyse par cytométrie de flux de la fraction positive des produits obtenus par cette méthode. La sélection des cellules sécrétant cette cytokine revient à sélectionner les lymphocytes T activés. Plusieurs publications présentent l'intérêt combiné des effecteurs cellulaires CD8+ et CD4+. En effet, si les CD8+ possèdent l'effet cytotoxiques, les CD4+ permettent non seulement d'aider l'activation des CD8+, mais aussi de conserver la mémoire immunitaire à long terme [53]. Les lymphocytes injectés se retrouvent ainsi plusieurs mois après l'injection chez le patient.

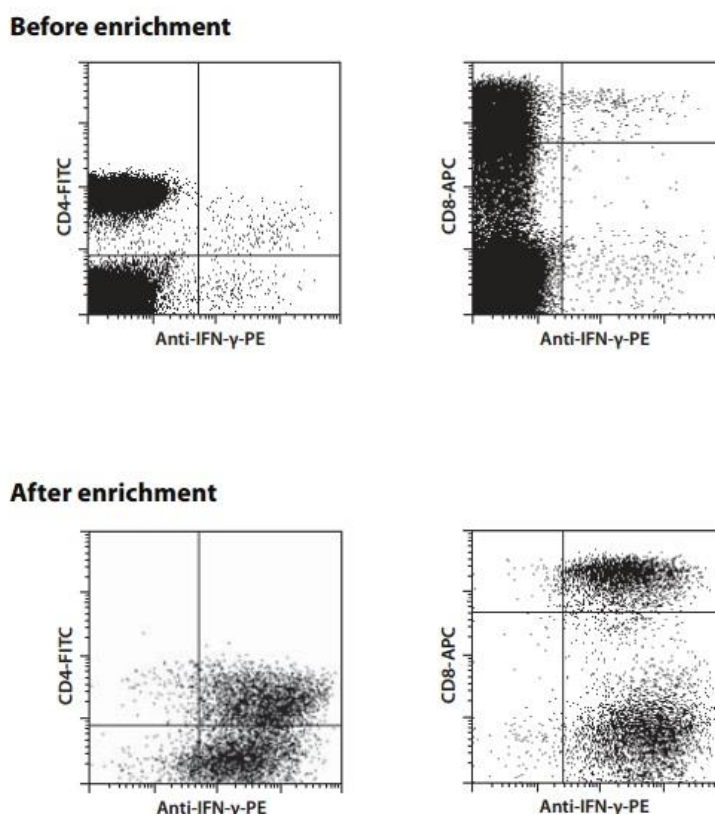


Figure 12 : Contrôle par cytométrie de flux de l'isolement des lymphocytes actifs [47]

Plusieurs équipes ont successivement utilisé cette méthode afin d'obtenir des CTL dirigés contre le CMV (Tableau 2). On peut noter que cette méthode a été progressivement améliorée du point de vue de la source d'antigène. En effet, l'activation cellulaire était réalisée au départ par un lysat de CMV [43]. La protéine pp65 a ensuite été identifiée comme une des principale source d'activation cellulaire [6]. La majorité des publications suivantes présente l'utilisation de pp65 de grade clinique fourni par la société Miltenyi sous forme de protéine recombinant [5] ou de peptides (Peptivator) [54].

Les rendements ainsi obtenus sont très importants: cette méthode permet de passer de $0.56\% \pm 0.7\%$ à $65\% \pm 31\%$ de cellules T spécifiques du CMV [55].

Cible	Source d'antigène	Référence	Année
CMV	peptides: Peptivator CMV	[54]	2011
CMV	protéine: recombinant pp65	[5]	2010
CMV	peptide: pool de peptides	[56]	2009
ADV et CMV	monocyte présentant pp65 après utilisation d'un virus recombinant	[46]	2008
CMV	protéine : recombinant pp65	[6]	2007
CMV	protéine: recombinant pp65	[57]	2004
CMV	peptides: HLA-restricted CMV synthetic peptides from pp65 and IE	[55]	2004
CMV	CMV lysat	[43]	2002

Tableau 2 : Production de CTL anti-virus par sélection immunomagnétique lié à la sécrétion d'IFN γ : virus cible et source d'antigène

Les résultats cliniques obtenus en injectant le produit de cette méthode sont très encourageants. Après administration à 7 patients, 5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique une expansion des CTL anti-CMV a été retrouvée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable [6]. Les 5 patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse antivirale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux. Une seconde étude a été sur 18 patients pour lesquelles a été constaté une infection ou une maladie à CMV. Pour 12 des patients il a été observé à une résolution ou diminution significative de la charge virale [40]. Autre point d'importance, dans ces deux études aucun effet secondaire, notamment de GvH n'a été mis en évidence.

Cette approche offre plusieurs avantages, parce qu'elle est simple à mettre en œuvre, rapide et peut être aisément standardisée avec différents antigènes infectieux pour des approches d'immunothérapie cellulaire adoptive spécifique.

1.3. Le cytomégalovirus

Le virus contre lequel sont dirigés les CTL présentés dans cette thèse est le cytomégalovirus. Ce virus de la famille des Herpès est en effet responsable de graves complications post-greffe énoncées précédemment [22].

1.3.1. Classification

Le CMV fait parti de la famille des *Herpesviridae*, comme l'Herpes Simplex Virus (HSV), l'Epstein Barr virus (EBV) ou le Varicelle Zona Virus (VZV). Cette famille se caractérise par sa capacité à produire des infections latentes et persistantes.

Il existe plusieurs cytomégalovirus. L'espèce *Human herpesvirus 5 (HHV-5)* ou *Human cytomegalovirus (HCMV)* correspondant au CMV retrouvé chez l'Homme.

1.3.2. Structure

La particule viral est composée d'un génome à double brin linéaire d'ADN, d'une capside icosaédrique, d'une enveloppe à double couche lipidique recouverte de glycoprotéines et du tégment séparant enveloppe et capside.

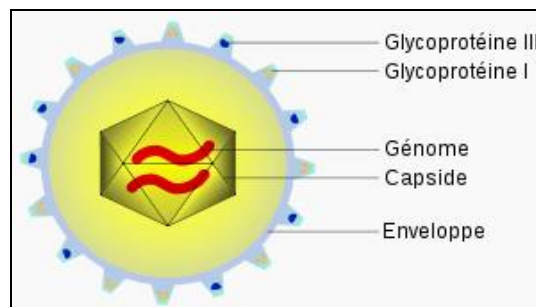


Figure 13 : Schéma de la structure du cytomégalovirus [58]

Les protéines codées par le CMV, environ 180 [59], sont désignées par le numéro du cadre de lecture correspondant, précédé d'une indication de la nature de la protéine (p : protéine, pp : phosphoprotéine, gp : glycoprotéine).

Une protéine d'intérêt pour cette thèse est la pp65 du tégment du virus [60]. Elle est également désignée sous le terme de ppUL83. C'est donc une phosphoprotéine correspondant au cadre de lecture n°65 de la séquence UL du génome du CMV. La protéine pp65 est une « early » protéine présente avant l'expression des gènes viraux dans la cellule et détectée dans les 24h suivant l'infection des cellules cibles [7]. Elle joue un rôle important dans l'activation de l'immunité humorale et cellulaire spécifique dirigée contre le CMV [22]. Une partie de la réponse CTL naturellement créée lors d'une infection à CMV est dirigée contre cet antigène. L'absence de ces CTL est donc de mauvais pronostic en cas de maladie à CMV [23].

1.3.3. Epidémiologie

L'Homme est le seul réservoir de ce virus et sa transmission se fait par contact car c'est un virus très fragile. Ce virus ubiquitaire se transmet par tout type de sécrétion corporelle (salive, sang...), le plus souvent lors de l'enfance [60]. Cette infection a une répartition mondiale sans rythme saisonnier. La prévalence est de 30 à 70% dans les pays d'Europe de l'ouest (50% en France) et d'Amérique du nord, et de 80 à 100% dans les pays en voie de développement.

Cette prévalence importante dans la population générale explique sa présence dans plus de la moitié des greffons de CSH [14].

1.3.4. Dissémination au sein de l'organisme

Après la primo-infection, le CMV peut persister à l'état latent chez un individu sain, et se réactiver en cas d'immunodéficience [3] [8]. La virémie constatée est donc endogène suite à une réactivation ou réinfection, ou exogène comme lors d'une greffe de CSH (Figure 14)

Le CMV a pour organe cibles les tissus sanguins, la moelle osseuse et le système nerveux central. Il a pour tropisme cellulaire de latence les monocytes circulant (dans 50 à 90% des cas [7]) et les progéniteurs de la moelle osseuse de type CD34+. Les cellules d'intérêts de la greffe de CSH que sont les CD34+ sont donc très probablement contaminées si le donneur est séropositif pour le CMV.

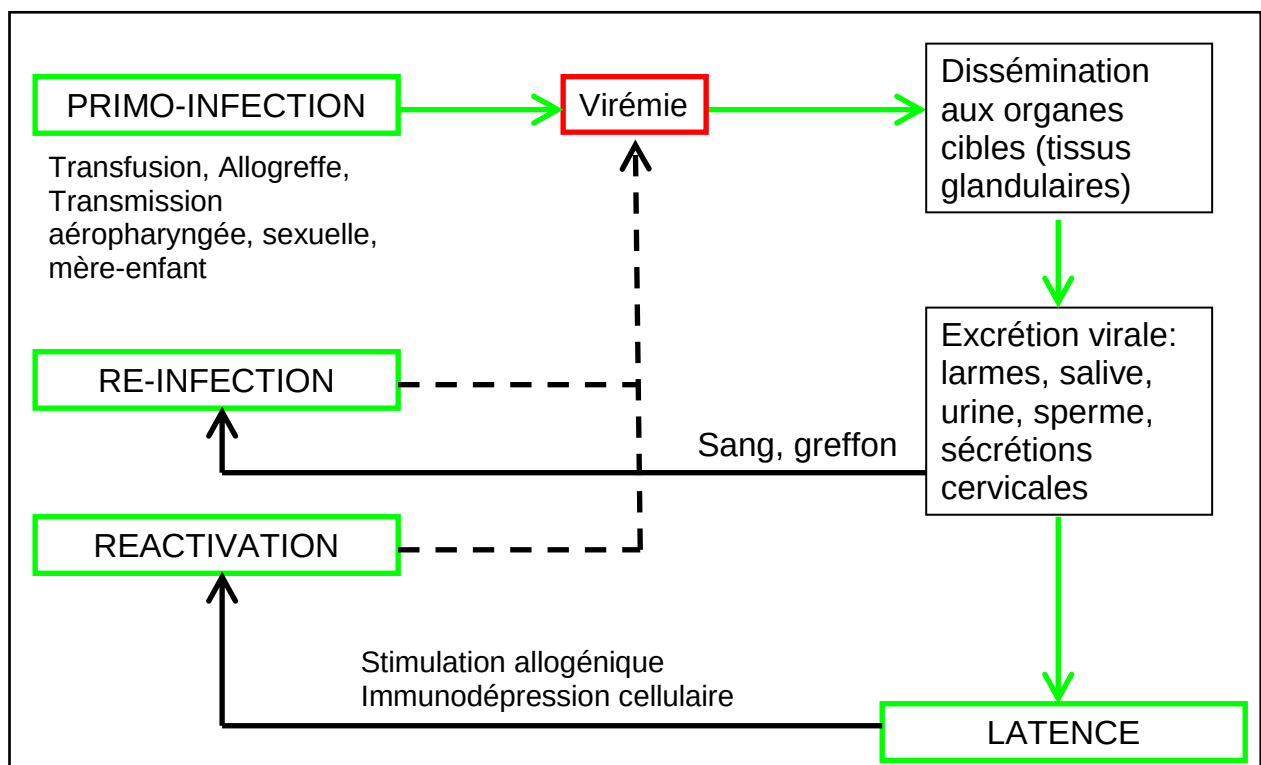


Figure 14 : Physiopathologie de l'infection à cytomégalovirus [59]

1.3.5. Manifestations cliniques

Il faut distinguer l'infection à CMV de la maladie à CMV.

En effet, l'infection à CMV correspond à la contamination (primo-infection ou re-contamination) du patient par le CMV, qui peut ou non se manifester par des signes cliniques. Ces signes sont principalement un syndrome mononucléosique pouvant faire penser à une infection à EBV, suivi de fièvre et maux de têtes.

La maladie à CMV correspond à l'apparition de signes cliniques (fièvre, atteinte d'organes...) durant la phase de dissémination du virus dans l'organisme [59]. Ces manifestations les plus sévères sont les rétinites et encéphalites.

1.3.5.1. Sujet immunocompétent

Il est très rare qu'une maladie à CMV se déclare chez le patient immunocompétent. L'immunité innée et l'immunité adoptive sont toutes deux importantes pour contrôler cette infection virale. Elle passe inaperçue dans la plupart des cas, sans aucun signe clinique. Une fièvre prolongée est la manifestation la plus classique durant la phase d'infection.

Il est à noter qu'une infection à CMV chez la femme enceinte peut provoquer des lésions chez le fœtus. Elle reste la première cause d'infection congénitale dans le monde [59].

1.3.5.2. Sujet immunodéprimé

Les cas les plus graves se retrouvent chez les patients immunodéprimés. Il est plus sensible à tout type d'infection et donc la maladie à CMV se présentera avec des signes beaucoup plus graves. C'est par exemple une des infections opportunistes les plus fréquentes chez les patients sidéens [7]. Jusqu'à 25% développent une rétinite à CMV.

Une fièvre persistante avec un pic le midi se résorbant durant la nuit est le signe caractéristique de la phase de dissémination. Les manifestations pulmonaires sont de très mauvais pronostic : sans traitement, 70% des patients décèdent de cette pneumopathie à CMV [59]. Rétinite et encéphalite sont également redoutables, mais les antiviraux utilisés contre ces deux pathologies ont amélioré leur pronostic [60].

Lors d'une greffe de CSH, la maladie à CMV se déclare soit suite à une primo-infection, soit suite à la réactivation du virus latent chez le patient ou son greffon (Figure 14). La

mortalité importante chez les patients immunodéprimés est principalement liée à deux phénomènes distincts. Tout d'abord ces virus se révèlent souvent réfractaires aux traitements antiviraux communément utilisés (en plus d'une toxicité intrinsèque au traitement médicamenteux [3]). Ensuite, comme expliqué précédemment, l'immunité adoptive met un certain temps à retrouver un niveau suffisant pour lutter contre ces infections [4]. L'absence d'une quantité suffisante de CTL CD8+ spécifique du CMV et Lymphocyte T Helper CD4+ sont à la base de ce manque de réactivité face à l'infection.

1.3.6. Diagnostic

Le diagnostic peut se faire de façon direct ou indirect [7]:

- direct par la recherche de virus en culture, des antigènes (pp65), ou de son génome par PCR.
- Indirect par la recherche d'anticorps dirigés contre le CMV.

La séropositivité est définie par la présence d'IgG spécifiques dans le sérum.

Le diagnostic de maladie à CMV est défini par la présence de virus dans l'organe atteint et dans le sang [59].

1.3.7. Traitements

Les infections à CMVH sont traitées par antiviraux (Tableau 5). Il existe actuellement trois molécules principales :

- le Ganciclovir (Cymevan®, Roche)
- le Cidofovir (Vistide®, Pfizer)
- le Foscarnet (Foscavir®, Astra Zeneca)

Pour la prophylaxie, il est possible d'utiliser l'Aciclovir et le Valaciclovir (prodrogue de l'Aciclovir).

Toutes ces molécules inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale UL54 et sont donc sans action sur le virus latent (Figure 15).

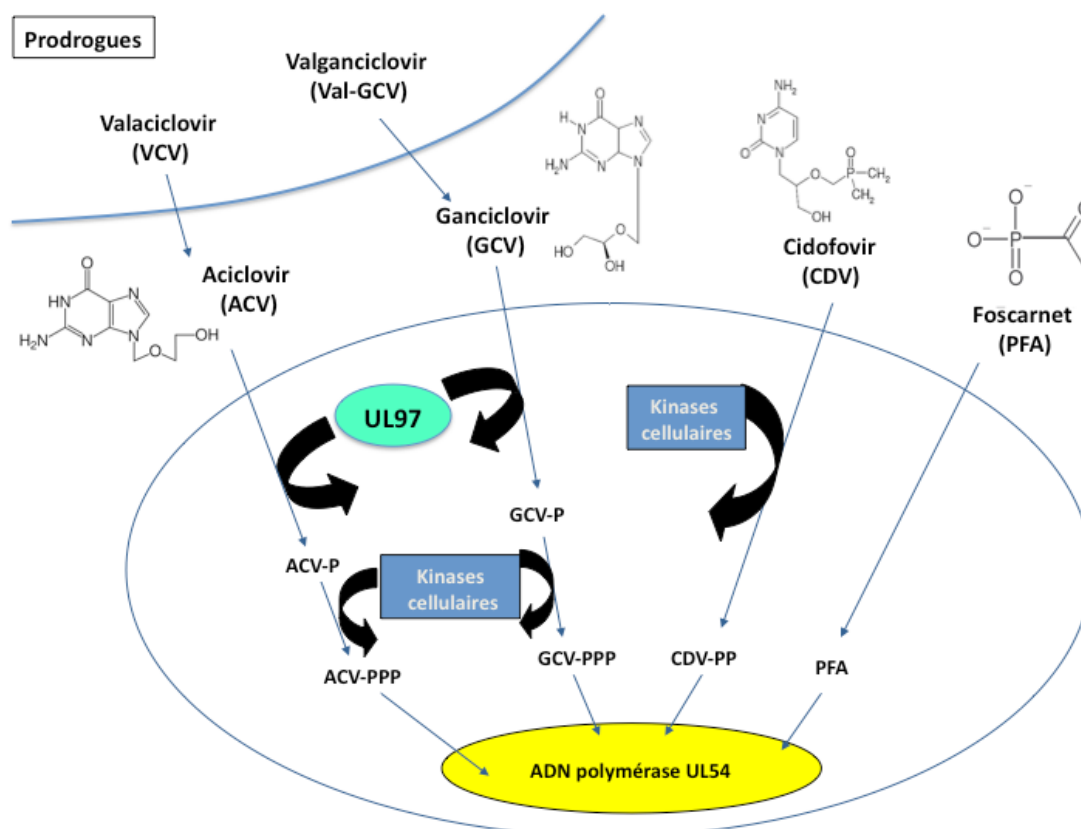


Figure 15 : Mode d'action des antiviraux dirigés contre l'ADN polymérase du CMV [61]

Historiquement, les premiers antiviraux utilisés sont des homologues nucléotidiques inhibiteurs de l'ADN polymérase virale et qui s'incorpore dans l'ADN viral durant sa réplication : Aciclovir, Valaciclovir (prodrogue de l'Aciclovir), Ganciclovir, Valganciclovir (prodrogue du Ganciclovir). Ils sont activés par la thymidine kinase virale. Ils sont administrés par voie orale ou par intraveineuse. Leur manque d'efficacité et/ou leur myélotoxicité en font des traitements de 2^{ème} intention contre les manifestations cliniques de maladie à CMV. Ils sont cependant très utilisés en prévention pour les patients à risques après transplantation [62].

C'est aujourd'hui le Foscarnet qui est le plus largement utilisé chez les patients immunodéprimés touchés par le CMV. Cet homologue de l'anion pyrophosphate inhibe sélectivement l'ADN polymérase virale sans activation par thymidine kinase. Le Cidofovir ne nécessite pas non plus d'activation par cette kinase et doit seulement être diphosphorylé pour acquérir son activité d'inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale. Ces deux molécules sont donc indiquées lorsque les virus deviennent résistants au Ganciclovir. Leur néphrotoxicité en limite leur utilisation pour les personnes à risque rénal important [61].

1.3.7.1. Traitement prophylactique

Les receveurs à risque de réactivation du CMV (receveur et /ou donneur CMV+) reçoivent un traitement prophylactique le plus souvent à base de Valganciclovir, Aciclovir ou Ganciclovir [21].

Ces traitements contribuent à retarder les premières manifestations de l'infection et diminuent la mortalité associée après greffe. Cependant ils seraient possiblement à l'origine d'un retard du rétablissement de l'immunité spécifique dirigé contre le CMV [22]. Ceci serait dû soit à un effet inhibiteur direct du Ganciclovir sur les lymphocytes T, soit d'un effet direct sur la réponse antivirale. En effet, en inhibant la prolifération du CMV, seules les protéines IE et E (immédiat early et early) se retrouvent présentées par le CMH, et ralentiraient donc l'acquisition de l'immunité contre le CMV.

1.3.7.2. Traitement préemptif

Il s'agit ici de traiter le patient seulement si le patient fait une séroconversion ou si la virémie à CMV augmente [63]. Il nécessite donc un suivi hebdomadaire de la virémie [62]. Le traitement est le même que le traitement curatif, mais il est débuté avant l'apparition de signes cliniques. L'intérêt est de limiter les effets délétères des antiviraux en ne les utilisant qu'en cas de variation de la sérologie à CMV du patient.

1.3.7.3. Traitement curatif

Il est mis en place seulement lors de l'apparition des signes cliniques de la maladie à CMV. Il consiste en l'administration des traitements antiviraux actifs sur le CMV.

Le traitement de référence est l'Aciclovir. Son efficacité est suffisante pour les patients immunocompétents.

Le Ganciclovir a révolutionné le traitement des infections sévères chez les immunodéprimés [62]. Il a permis d'améliorer de façon importante le pronostic des pneumopathies chez le greffé de moelle. Le Ganciclovir a donc remplacé l'Aciclovir pour ces patients car il est plus efficace dans le traitement de la maladie. Il est cependant beaucoup plus toxique, notamment pour les cellules de la moelle osseuse. Sa prodigue, le Valganciclovir, a désormais remplacé le Ganciclovir car il est à la fois plus efficace et possède une bonne biodisponibilité par voie orale [62]. Le Foscarnet est utilisé en deuxième ligne en cas de résistance au Ganciclovir. Son activité en l'absence de thymidine kinase et l'absence de myélotoxicité en font un traitement d'importance chez les patients greffés en CSH [63].

2. Analyse SWOT : place du transfert adoptif de CTL dans le traitement des complications infectieuses après greffe de CSH : exemple des CTL anti-CMV

2.1. Intérêt d'une analyse par matrice type « SWOT »

L'analyse SWOT est un outil d'analyse stratégique. Elle permet d'analyser l'environnement externe et interne à un projet. L'environnement interne correspond aux caractéristiques du projet pouvant être modifiées. On distingue les forces (« **Strengths** ») et les faiblesses (« **Weaknesses** ») intrinsèques au produit. L'environnement externe correspond aux éléments sur lesquels le projet ne peut influencer, mais qui impactent son intérêt. On y distingue les opportunités (« **Opportunities** ») et les menaces (« **Threats** »).

Elle n'a pas pour objectif de présenter si un projet est bon ou mauvais mais les forces en jeu pour une problématique à un moment donné. Elle permet de visualiser rapidement la concordance d'un projet à une problématique. Une des limites de cet outil est qu'il ne peut être exhaustif sans altérer sa lisibilité.

Cette analyse est représentée sous forme de tableau combinant ces 4 éléments suivant leur impact positif ou négatif sur le projet :

Matrice SWOT	Positif	Négatif
Interne	Forces : à consolider	Faiblesses : à sécuriser
Externe	Opportunités : à développer	Menaces : s'en prémunir

Tableau 3: Présentation de l'analyse SWOT

De nombreuses publications médicales utilisent l'analyse SWOT pour présenter leur résultats : campagne de vaccination [64], évaluation de nouvelles pratiques médicales [65], organisation des systèmes de santé [66]... Cette approche est particulièrement recommandée pour évaluer les nouvelles technologies [65]. Il est également intéressant de donner une note à chaque élément ajouté en tableau pour visualiser la criticité des éléments cités [65]. On sépare ainsi les éléments ayant un impact fort sur le projet de ceux qui en ont peu.

Nous analyserons ici la place du transfert adoptif de CTL dans le traitement des complications infectieuses après greffe de CSH en prenant l'exemple des CTL anti-CMV. Plus particulièrement, nous mettrons en évidence les points forts et points faibles des lymphocytes obtenus par méthode de sélection immunomagnétique.

Le contenu des 4 parties de l'analyse SWOT sera d'abord argumenté séparément, puis rassemblé dans un tableau récapitulatif.

2.2. Forces

2.2.1. Des études cliniques encourageantes : efficacité et innocuité

Les CTL anti-infectieux sont des produits dont l'efficacité est testée depuis plusieurs années. Ces essais cliniques continuent à démontrer l'intérêt des CTL dans le traitement des infections virales après greffe de CSH. Quel que soit les virus ciblés jusqu'à aujourd'hui (CMV, ADV, EBV et influenza principalement), les résultats mettant en évidence une diminution de la charge virale chez tous les patients infectés et une augmentation du répertoire T spécifique [67].

Les CTL anti-CMV obtenus par les différentes méthodes de production présentés précédemment, sont actuellement inclus dans plusieurs études cliniques de phase I et II [68] [69]. Le tableau suivant regroupe une partie des résultats cliniques finalisés ayant utilisés ce produit :

Procédé de production	Cellules injectées	Patients traités	Résultats	Référence
Sélection tétramères	Lymphocytes T CD8+	9 patients avec virémie ou post-réactivation	9/9 : diminution de la charge virale.	[49]
Culture cellulaire	Lymphocytes T CD4+ et CD8+	23 patients avec infection CMV. 19 patients évaluable.	17/19 : réponse positive au traitement : diminution de la charge virale et/ou absence de maladie à CMV.	[70]
Sélection IFN γ	Lymphocytes T CD4+ et CD8+	18 patients avec infection ou une maladie à CMV	12/18 : résolution ou diminution significative de la charge virale	[40]
Sélection IFN γ	Lymphocytes T CD4+ et CD8+	Injection à 7 patients : - 5 après réactivation de la charge virale - 2 en prophylactique	7/7 : expansion des CTL anti-CMV. 5/7 : thérapie antivirale de plus courte durée.	[6]

Tableau 4 : Essais cliniques ayant utilisées des lymphocytes T anti-CMV après allogreffe de CSH.

Les taux de réponse sont particulièrement intéressants contre le CMV : en 2005, des CTL obtenus par sélection tétramères ont permis de voir la charge virale diminuer chez l'ensemble des 9 patients traités [49]; en 2014, dans un nouvel essai clinique avec des produits issus de banque de CTL tierce partie obtenus par culture cellulaire, 74% des patients avec une maladie à CMV réfractaire aux traitements antiviraux classiques ont répondu au traitement [70]. Les

premiers résultats sont très encourageants avec une efficacité importante en l'absence de toxicité à court et moyen terme.

Concernant les CTL anti-CMV obtenus par méthode de sélection immunomagnétique lié à la sécrétion d'IFN γ plusieurs études présentent également des résultats démontrant l'efficacité de ce produit. Après administration à 7 patients, 5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique une expansion des CTL anti-CMV a été retrouvée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable [6]. Les 5 patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse antivirale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux. Une seconde étude a été réalisée sur 18 patients pour lesquels a été constatée une infection ou une maladie à CMV. Pour 12 des patients il a été observé à une résolution ou diminution significative de la charge virale [40].

Autre point d'importance, dans ces différentes études aucun effet secondaire, notamment de GvH n'a été mis en évidence [70]. Un bilan des effets secondaires observés après injection de CTL anti-infectieuses au cours de 10 années d'expérience [43] a ainsi identifié un taux d'évènements indésirables de 17.3%, dont aucun grave. La majorité des évènements indésirables seraient plutôt attribuables au cryoprotecteur (le DMSO) ou au diphenhydramine administré en pré-médication qu'aux CTL eux-mêmes. Les auteurs concluent qu'une surveillance du patient d'1 heure après l'injection des CTL est suffisante.

Les CTL anti-infectieux tels que les CTL anti-CMV sont donc des produits efficaces et sûrs à même de répondre aux problématiques actuelles de résistance des souches de CMV chez des patients le plus souvent affaiblis du point de vue immunitaire.

2.2.2. Spécificité et synergie

La méthode de production par sélection immunomagnétique lié à la sécrétion d'IFN γ permet d'isoler de façon spécifique le répertoire CTL en même temps que les lymphocytes T helper [6]. Plusieurs publications présentent l'intérêt combiné des effecteurs cellulaires CD8+ et CD4+. En effet, si les CD8+ possèdent l'effet cytotoxiques, les CD4+ permettent à la fois d'aider l'activation des CD8+, mais aussi de conserver la mémoire immunitaire à long terme [53]. Une des forces de la méthode présentée ici est donc d'isoler une combinaison de ces deux populations de lymphocytes T anti-CMV.

La spécificité d'action de ce produit lui permet de limiter le risque de réaction contre l'hôte, décrite par exemple lors d'injection de produit non spécifique comme les DLI [38].

2.2.3. Outils optimisées pour des produits de grade clinique

L'approche de sélection présentée ici offre plusieurs avantages techniques pour les sites de production souhaitant le mettre en œuvre.

Tout d'abord, comme présenté par la suite dans cette thèse (cf. §3), l'ensemble des manipulations de ce produit stérile sont réalisées dans un milieu fermé grâce au système de poches utilisée. Le risque de contamination est donc maîtrisé et tout site de production stérile peut aisément adapter une salle blanche à la réalisation des différentes manipulations.

Ensuite, les temps de production présentés ici sont inférieurs à 48 heures [5] [54] et permettent donc une obtention rapide pour faire face à la dégradation de l'état du patient en cas de maladie à CMV grave.

De plus, le procédé peut être aisément standardisé pour une utilisation avec un panel de différents antigènes infectieux pour des approches d'immunothérapie cellulaire adoptive spécifique [71].

Cette méthode optimisée pour l'obtention simple, rapide et standardisée permet surtout d'obtenir des produits de grade clinique. En effet, l'ensemble des réactifs et dispositifs présentés par la suite sont conformes aux différentes normes en vigueur : les réactifs utilisés sont autorisés pour un usage clinique et les éléments tels que les poches de culture sont des dispositifs répondant aux normes CE [47]. Le produit présenté ici a pour objectif d'être produit au sein de l'UIC de Nantes qui est un site de production agréé pour la fabrication de produits de thérapie cellulaire. Un autre site de production de l'EFS de Nantes est Atlantic Bio GMP (ABG), qui possède aujourd'hui le statut d'établissement pharmaceutique délivré par l'ANSM. Nous avons donc ici l'ensemble des éléments nécessaires permettant l'obtention de produits autorisés par les autorités de santé.

2.3. Faiblesses:

2.3.1. Compatibilité donneur/receveur

Comme tout traitement de thérapie cellulaire, l'injection de CTL doit son efficacité à la compatibilité entre donneur et receveur : l'activité du produit est HLA dépendante [72]. Donneur et receveur doivent être compatibles de ce point de vue pour espérer retrouver l'activité présentée dans les différentes études cliniques. Ceci limite donc de façon importante les possibilités d'utilisation des traitements produits. Comme pour les greffes de CSH, le traitement devra être produit spécifiquement pour chaque patient en prenant en compte les différents paramètres d'histocompatibilité.

Il en va également de la sécurité du patient. En effet, la compatibilité entre donneur et receveur permet de limiter l'effet possible de GvHD [38]. Le produit obtenu contient en majorité des L_T antivirus activés. Mais il contient également tout le répertoire L_T non spécifique du virus et peut donc contenir des L_T susceptibles de générer une alloréactivité. Les produits obtenus par cette méthode doivent donc être injectés à des patients avec un niveau de compatibilité HLA suffisant pour en garantir la sécurité. Chaque production devra donc être clairement identifiée afin de ne permettre aucune confusion lors de l'administration au patient. Il est à noter que par production par culture cellulaire, après 4 stimulations successives, certaines études mettent en évidence que le produit obtenu a perdu toute alloréactivité contre le patient et a même pu être injecté chez un patient avec une incompatibilité de 3 antigènes HLA [43].

2.3.2. Maitrise du procédé

La durée de production importante par certaines méthodes comme la culture cellulaire comparée à l'aggravation rapide possible de l'état du patient obligent le recours à des méthodes nécessitant des réactifs plus complexes comme les méthodes immunomagnétiques [40]. La production doit donc être réalisée dans des établissements avec des équipements spécifiques, à la fois pour la production et le contrôles des CTL.

De plus, de nombreuses opérations manuelles de prélèvements et transfert de produits via les poches utilisées nécessitent un niveau de qualification important du personnel dédié à ces opérations de préparations. Ce procédé n'étant encore pas utilisé en routine, sa maitrise est un élément indispensable à la production de produits de qualité. Ceci devra passer obligatoirement par l'habilitation du personnel à son utilisation.

2.3.3. Produit injectable

Le produit présenté ici est un produit injectable et comporte donc l'ensemble des contraintes relatives à cette forme pharmaceutique.

En amont, ceci implique des contraintes de production : un environnement spécifique et normes de contrôle qualité adéquat sont nécessaires à l'obtention des produits injectables : salles « blanches », personnel qualifié... Une réglementation stricte décrite dans les Bonnes Pratiques de Thérapie Cellulaire [10] doit donc être adoptée dans les établissements souhaitant mettre en œuvre ce procédé.

La stérilité du produit doit également être conservée jusqu'à l'injection au patient. Cette contrainte implique un environnement spécialisé et le personnel qualifié pour son administration. Cette faiblesse intrinsèque au produit est à mettre en parallèle avec l'environnement dans lequel il est administré. En effet, les patients sont déjà dans un contexte hospitalier et ce traitement est un élément supplémentaire de l'arsenal thérapeutique.

2.4. Opportunités

2.4.1. Augmentation du nombre de patients potentiels

Les greffes de cellules souches hématopoïétiques ont plus que doublé entre 2000 et 2009 en France [2]. Plus de 1500 patients bénéficient chaque année de ce traitement en France, ce qui fait autant de patients potentiels pour le traitement par CTL anti-CMV. A cela s'ajoute tous les patients souffrant d'immunodéficience liée à d'autres types de transplantation où le CMV peut alors entraîner des complications importantes.

De plus les traitements antiviraux utilisés actuellement ne sont pas dénués d'effets secondaires et peuvent conduire à l'émergence de résistances [61]. Peu d'études de résistance ont été menées chez les patients ayant reçu une greffe de CSH. On peut cependant noter que chez les receveurs d'organe solide, l'incidence de la résistance au Ganciclovir varie entre 0,28 et 9% selon les études et peut atteindre 27% chez les receveurs de transplantation pulmonaire, séronégatifs avant greffe [61].

Ce phénomène participe à l'augmentation du nombre d'épisodes virémiques pouvant alors engendrer des maladies à CMV ou un rejet du greffon avec une élévation du risque de décès. Le recours plus systématique des CTL pourrait alors limiter ces effets secondaires.

2.4.1. Coût du traitement en baisse

Le coût de revient de ce type de traitement est en train de diminuer fortement. En effet, le prix d'un kit de sélection immunomagnétique, un des principaux postes de dépense de ce mode de production, coûtait 4300€ en 2011. Le même kit de la société Miltenyi Biotec est désormais affiché en 2014 à 2554€ [71].

On peut également présenter le coût d'un traitement par CTL anti-EBV actuellement produit par l'équipe de Rooney et al, qui est actuellement de 6085\$ (4563€) [40]. Ce prix comprend la production, le contrôle qualité et l'injection au patient, sans compter le coût de la main d'œuvre. La même équipe présente un produit multi-virus (dirigés contre l'EBV, l'ADV et le CMV) pour 10659\$ (8000€).

Ce traitement devient tout à fait compétitif comparativement à certains traitement utilisés pour lutter contre les conséquences de l'infection liées à ce virus. En effet, il est utilisé pour lutter contre la maladie lymphoproliférative engendrée par l'EBV un anticorps monoclonal anti-CD20 qui coûte 9000\$ (6750€) par injection, pouvant être renouvelée.

Dans la suite de cette thèse, nous arrivons à un total de 5139€ concernant le cout des matières et consommables nécessaires à la production de CTL anti-CMV (cf. Tableau 6). Cette valeur est relativement proche du cout présenté par les équipes de Rooney. Ce total théorique ne prend pas en compte les économies d'échelle possible lors de commande en quantité importante chez les différents fournisseurs.

Il convient également de présenter l'estimation faite du coût du traitement pour un patient atteint de rétinite à CMV. En effet, mis bout à bout l'ensemble du traitement annuel comprenant les antiviraux (Ganciclovir principalement), mais également les médicaments destinés à limiter leurs effets indésirables, coûterait entre 30 000 et 100 000\$ [73].

Certaines méthodes de production sont présentées comme coutant autant voire moins cher que 28 jours de traitement antiviral [74], sans compter les coûts liés à leur administration et les complications liées aux traitements classiques. Toujours selon l'équipe de Rooney et al, avec la simplification des procédés et la production de volume plus important de CTL, son coût d'obtention pourrait dans les années à venir être rapidement divisé par 3, augmentant d'autant son intérêt.

De plus, il a été présenté dans une étude clinique de 2013 incluant 50 patients que l'utilisation des L_T permet de diviser par deux le recours et la durée d'utilisation des antiviraux classiques en ayant le même niveau de réactivation du CMV [75]. Ce produit permet donc à la fois de faire l'économie financière d'une partie du traitement antiviral classique, mais permet surtout de se prévaloir de leurs effets secondaires délétères chez ces patients déjà affaibli par la greffe de CSH.

2.4.2. Adaptabilité pour d'autres indications

La méthode de production présentée ici est facilement transposable pour la production de CTL dirigés contre d'autres virus et potentiellement contre tout type d'antigène d'intérêt:

- Virus : EBV[72], ADV [76]
- Cancer : lymphome, mélanome [53]

Cette méthode de production a également pour avantage de permettre l'expansion de CTL dirigés contre plusieurs virus. Certaines équipes ont, par exemple, produits des CTL multi-virus dirigés à la fois contre le CMV, mais également contre l'Adénovirus et l'Epstein-Barr virus [46] [13]. Ces équipes obtiennent ainsi un outil ciblant les 3 principaux virus pathogènes après greffe de CSH. La difficulté est ici d'obtenir une activité relativement homogène contre les différentes cibles.

2.4.3. Création de banques de CTL

Comme évoqué plus haut, une des faiblesses de ce produit est qu'il ne peut être injecté qu'à un patient avec un degré d'histocompatibilité minimal. On imagine donc un traitement produit à la demande. Le risque étant de ne pas trouver de donneur compatible dans un délai ne risquant pas de mettre en jeu la vie du patient. Il a alors été imaginé par plusieurs équipes de créer des banques de CTL : après obtention du produit d'intérêt, les cellules sont conservées en azote liquide où la congélation permet de les conserver à plus long terme. De plus, le produit peut être aliquoté et donc être utilisé par la suite pour plusieurs patients compatibles [77]. La création d'une banque de CTL obtenu à partir de donneurs homozygote sur 16 allèles confère une couverture de 80% de la population caucasienne [70]. C'est une étape supplémentaire dans l'utilisation des CTL.

En effet, on peut postuler que le surcoût de production serait minime. Mais la possibilité de réinjecter les CTL à plusieurs (n) patients rendrait dès lors un coût unitaire équivalent à coût de production divisé par n. Les coûts deviennent alors très compétitifs comparés aux antiviraux.

2.5. Menaces

2.5.1. Un environnement réglementaire complexe

De nombreux produits de thérapies cellulaires comme celui présenté ici sont en cours de développement. Ces produits innovants entrent cependant dans un cadre réglementaire complexe pouvant comprendre un niveau national (premiers textes en 1996) et un niveau européen (directives de 2004 et règlement de 2007) [78]:

La réglementation européenne, élaborée et publiée après les textes français, impose de revoir les définitions et les bases réglementaires du cadre national. Certains produits considérés initialement par les textes français comme des "préparations de thérapies cellulaires", changent de statut et deviennent des "médicaments de thérapie innovante" au niveau européen (MTI, « Advanced Therapy Medicinal Product » en anglais (ATMP)). Ces changements de statut impactent la réglementation en France pour les produits et les établissements qui développent et souhaitent exploiter ces produits : les standards et référentiels de fabrication évoluent vers les bonnes pratiques de fabrication applicables aux médicaments [78].

Pour pallier à la complexité réglementaire, des exemptions hospitalières comme en France ont eu lieu à l'heure actuelle [79]. On parle de MTI « Préparés Ponctuellement » (MTI-PP) qui correspond aux autorisations temporaires délivrées précédemment et « utilisés au sein du même État membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé » [78].

Un autre cas particulier reste encore présent dans la réglementation : les préparations cellulaires ou tissulaires : Ces préparations à finalité thérapeutique contiennent des tissus ou des cellules qui ne répondent pas aux définitions des MTI. Elles sont identifiées à l'article L.1243-1 du code de la santé publique. L'autorisation de mise sur le marché est délivrée par l'Agence après évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité du produit. [78] Elle est purement nationale : il n'existe pas de procédure d'autorisation européenne. Les préparations cellulaires ou tissulaires entrent dans le domaine d'application de directive tissus et cellules 2004/23/CE.

Pour rester dans le cadre des préparations, le produit final doit respecter deux conditions :

- les modifications apportées aux cellules ou tissus ne doivent pas être substantielles, c'est-à-dire que les propriétés essentielles des cellules ou tissus n'ont pas été modifiées.
- les cellules et tissus doivent être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur.

A ce titre, il est possible de considérer que les CTL anti-CMV présentés ici peuvent rentrer dans cette définition au même titre que les CSH allogéniques. Mais ce produit n'ayant pour le moment pas obtenu d'autorisation de mise sur le marché (AMM), mais seulement des autorisations temporaires données aux services cliniques d'hôpitaux publiques, il n'est pas encore classé comme MTI ou PTC.

Ces produits fabriqués par les hôpitaux pour des études cliniques ont été une bonne chose pour réaliser de nombreux essais. Mais désormais, ces produits à fort potentiel d'efficacité ne peuvent être testés à plus grande échelle car il existe peu de site de production agréé pour leur production [79]. C'est pourquoi des investissements importants du secteur public sont réalisés pour créer des sites de production cGMP compliant, comme l'Atlantic Bio GMP de l'EFS.

Cependant, ce cadre réglementaire reste peu connu des acteurs académiques ou privés, expliquant en partie la frilosité des acteurs historiques de l'industrie pharmaceutique pour ces produits. Malgré l'obtention de nombreuses données cliniques concernant ce produit, la production et les épitopes visés du virus varient d'une équipe à l'autre et rendent difficiles les méta-analyses sur l'activité de ces nouveaux traitements de thérapie cellulaire. De plus, il est difficile d'intégrer de grandes cohortes de patients dans les études cliniques pour l'indication de maladie à CMV car les patients décèdent rapidement après diagnostic de maladie à CMV résistante au traitement antiviral [63].

D'autres zones d'ombre restent également à éclaircir pour donner l'envie aux industriels de s'engager :

- Propriété intellectuelle sur des cellules de donneurs
- Niveau de remboursement du produit par les autorités de santé

2.5.2. Traitements concurrents

2.5.2.1. Traitements actuels :

Les trois molécules disponibles pour le traitement des infections à CMV sont [61] :

- un analogue nucléosidique, le Ganciclovir
- un analogue nucléosidique monophosphaté, le Cidofovir
- un analogue de pyrophosphate inorganique, le Foscarnet

Ces molécules inhibent l'activité de l'ADN polymérase virale UL54 et sont donc sans action sur le virus latent.

Leurs principaux défauts sont la résistance du virus à long terme, mais surtout les effets secondaires à court terme sur le patient (toxicité hématologique ou rénale).

2.5.2.2. Traitements en développement :

Un nombre important de traitement en cours de développement ont également pour objectif de prévenir ou traiter la maladie à CMV. Les éléments présentés ci-dessous en regroupent une partie :

- Nouvelles molécules antivirales [80] : de nouvelles molécules, recherchant parfois à s'attaquer à de nouvelles cibles sont en train d'être mise au point : ODE-CDV, CMX001, Cyclopropravir... Par exemple, le Maribavir : Cet inhibiteur spécifique de l'UL97 kinase est très prometteur et présente une activité in vitro importante. Il est actif sur les souches résistantes au Ganciclovir. Les études cliniques devront démontrer son efficacité.
- Vaccins :
 - Le CMV étant une source importante de complications congénitales, il a plusieurs fois été envisagé de mettre en place des campagnes de vaccination contre le CMV [59]. Aux Etats-Unis des études présentent l'intérêt de développer ce type de vaccin [81]. En 2004, 5 vaccins candidats sont recensés dans cette étude et sont toutes une menace pour le traitement présenté ici. En effet, si un vaccin se révèle à l'avenir à la fois efficace et appliqué à une campagne de vaccination importante, l'incidence des infections à CMV sera diminuée. La population générale étant moins contaminée, l'intérêt de développer une thérapie cellulaire sera d'autant diminué. Des essais cliniques utilisant différents type de vaccins sont

encore actuellement menés [82] [83]. Par exemple, le « VCL-CB01 », vaccin à contenant des plasmides est actuellement en phase II [84]. L'ADN code pour une partie des protéines d'intérêt du CMV (pp65, gB, IE1), activant l'immunité cellulaire.

- Autres traitement par thérapie cellulaires :
 - Injections de sang périphérique chargé en CTL : Certaines de ces études suggèrent que l'administration conjointe de la greffe avec un prélèvement spécifiques de sang périphérique d'un donneur CMV+ améliore cette reconstitution, car il présente une concentration importante en CTL spécifiques [85].
 - Vaccination par cellules dendritiques chargées en antigènes : cette approche permettant d'activer plus rapidement la réponse immunitaire. On parle alors de vaccination par cellules dendritiques activées par des antigènes. Pour le CMV, une des approches d'activation des ces cellules dendritiques est de les charger en protéine pp65. Une fois injectées, ces cellules vont mettre en marche l'immunité spécifique anti-CMV en induisant la production de lymphocytes T Helper et CTL spécifique de cet antigène. L'efficacité de cette méthode a été démontrée sur une patiente en 2010 ayant reçu une greffe de CSH d'un donneur séronégatif. L'infection à CMV échappait au traitement classique [31]. Après injection, la virémie s'est progressivement atténuée sans récurrence de maladie à CMV dans les 5 ans.

Les CTL anti-CMV produits par sélection immunomagnétiques se situent donc dans un segment où la recherche clinique est active et où d'autres traitements en cours de développement pourraient à terme lui faire concurrence.

2.6. Synthèse

Il est désormais possible de rassembler les différents éléments évoqués de l'analyse SWOT dans le tableau de synthèse ci-dessous :

Forces	Faiblesses
• Etudes cliniques encourageantes : • Efficacité, innocuité, spécificité et synergie • Outils optimisées pour des produits de grades cliniques	• Maîtrise du procédé • Produit injectable • Compatibilité donneur/receveur
Opportunités	Menaces
• Augmentation du nombre de patients potentiels : augmentation des greffes de CSH et de la résistance aux antiviraux • Coût du traitement en baisse • Adaptabilité pour d'autres applications : virus, cancer... • Banques de CTL	• Contexte réglementaire complexe • Traitements concurrents : • Actuels et futurs : antiviraux, vaccins, autres traitement de thérapie cellulaire

Les CTL anti-CMV doivent donc confirmer leur efficacité et innocuité par des études cliniques de plus grande envergure. Le procédé d'obtention, malgré une optimisation technique importante permettant d'obtenir rapidement des produits de grade clinique, passera par une phase d'apprentissage pour les équipes souhaitant le mettre en œuvre et devra s'appliquer avec la rigueur qu'implique l'obtention de produit de thérapie cellulaire.

Malgré un contexte concurrentiel important et une réglementation mouvante, ce produit peut s'appuyer sur un marché en croissance, un coût de revient en baisse, et un potentiel d'adaptabilité important pour d'autres applications.

3. Production de CTL anti-CMV au sein de l'UIC de Nantes : Analyse « 5M » des éléments du processus

3.1. Intérêt de l'analyse « 5M » en production

L'analyse 5M, ou diagramme d'Ishikawa, est un outil de gestion de la qualité. Ce diagramme rassemble les causes aboutissant à un effet. Cinq classes de causes distinctes sont proposées par cette méthode : matière, matériel, milieu, méthode et main d'œuvre. Il est principalement utilisé dans l'industrie comme aide à la résolution de problèmes : pour chaque « M », une liste de causes possibles ayant pu contribuer à l'occurrence du problème (effet) va être définie pour aboutir à une synthèse des causes du problème rencontré.

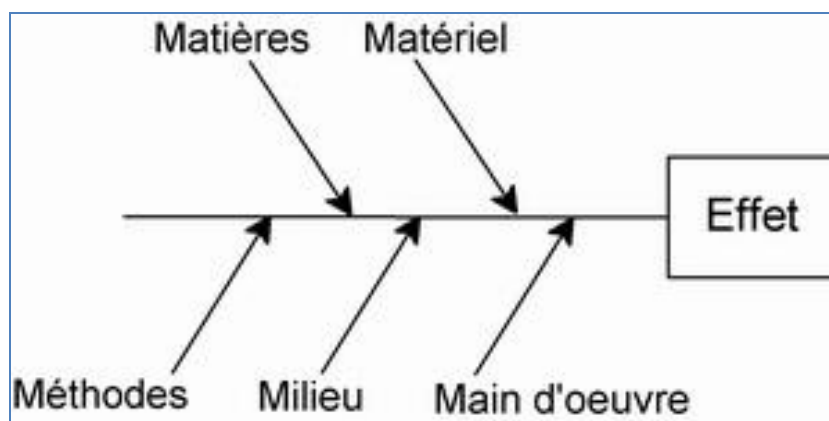


Figure 16 : Diagramme de causes et effets 5M

Son autre usage est l'identification et la gestion des points importants lors de la mise en place d'un projet. L'effet devient alors l'objectif à atteindre. On la retrouve donc dans des publications présentant la mise en place de nouveaux projets de production [86]. C'est par cet aspect que nous utiliserons ici cet outil permettant une classification rapide des données du projet.

Nous commencerons donc par présenter l'effet attendu du projet, le produit final. Puis nous synthétiserons les points importants du procédé de production selon cette classification.

3.2. Objectifs

L'objectif principal de cette analyse est de rassembler les éléments d'importance du processus d'obtention de lymphocytes T anti-CMV spécifiques du pp65 à partir d'un prélèvement de 10⁹ cellules mononuclées au sein de l'Unité d'Ingénierie Cellulaire de Nantes. Il est présenté ici les différentes étapes du procédé, de la réception du prélèvement jusqu'à la l'obtention du produit. Ceci correspond aux éléments nouveaux à maîtriser par l'UIC afin de produire ces LT (Figure 18).

Le second point d'importance apporté par cette analyse est de mettre en évidence les éléments permettant de proposer un procédé de production conforme aux règles de Bonnes Pratiques de Thérapie Cellulaire (BPTC). Ce texte dicté par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) depuis 2012) détermine les moyens à mettre en œuvre par l'établissement dans lesquelles les produits de thérapie cellulaire doivent être produits en France.

Les éléments de contrôle qualité à réception, en cours de production et sur le produit fini sont également présentés afin d'élargir la vision des éléments nécessaires au suivi et à la libération des produits obtenus.

La méthode de production présentée ici s'inspire de plusieurs publications (Tableau 10 : publications présentant l'utilisation de la colonne de séparation magnétique CliniMacs (Miltenyi Biotec) pour la production de différents types de CTL), notamment les équipes de Rooney et Einsele [5] [6] : à partir de prélèvement de cellules de donneurs séropositifs pour le CMV, les lymphocytes T spécifiques du CMV sont isolés par méthode immunomagnétique basée sur la sécrétion d'interféron γ (IFN γ) après stimulation ex-vivo par un antigène viral. Cette méthode permet une stimulation et une sélection rapide de Lymphocytes T anti-CMV. Elle décrit l'obtention d'une thérapie cellulaire à la demande en un délai court sans période d'expansion des cellules. La technologie d'isolement présentée ici se base sur l'utilisation d'une colonne et de réactifs de la société Miltenyi Biotec, permettant la production de produits de grade clinique [47].

3.2.1. Caractéristiques du produit obtenu : « effet » attendu du procédé :

Comme expliqué précédemment, l'objectif est d'obtenir des lymphocytes T possédant une activité antivirale dirigée contre le CMV, injectable à un patient. Le produit obtenu devra donc avoir comme caractéristiques principales, ou comme « effet » selon Ishikawa, les points suivants :

- Activité anti-CMV : la principale caractéristique du produit après sélection des cellules d'intérêt. Elle est vérifiable in vitro par plusieurs tests :
 - Cytotoxicité sur cellules infectés par le CMV : c'est l'effet attendu des cellules produites.
 - Concentration en L_T anti-CMV ($CD8+IFN\gamma+$ et $CD4+IFN\gamma+$) dirigés contre l'épitope pp65 du CMV : ces caractéristiques précises sont liées au procédé choisi ici et présenté par la suite [5].
- Compatibilité donneur/receveur : l'activité du produit étant HLA dépendante, donneur et receveur doivent être compatibles de ce point de vue [72]. Ceci permet également de limiter l'effet possible de GvHD lié à une incompatibilité [38]. Chaque production devra donc être clairement identifiée afin de ne permettre aucune confusion lors de l'administration au patient.
- Stérilité : le produit obtenu est un produit injectable et doit donc être stérile.

L'ensemble de ces éléments sera vérifié en fin de production via des contrôles qualités adaptés (Tableau 13) permettant la libération du produit.

3.3. Milieu :

Le milieu de production représente l'environnement de travail. L'impact principal du milieu sur ce projet est la capacité des locaux à participer à l'assurance de stérilité du produit. Il est nécessaire de réaliser les différentes étapes de production dans un environnement permettant de conserver cette caractéristique.

La méthode présentée ici s'appuie sur des étapes en milieu non ouvert. C'est-à-dire que le produit n'est jamais en contact direct avec l'air des zones de production. Il est confiné dans les poches de transfert et de manipulation des cellules. Les étapes les plus critiques du point de vue de la stérilité sont les phases d'injection de réactifs et milieu de culture dans ces poches. En effet, ces étapes impliquent la manipulation par des techniciens de produits stériles (aiguilles, réactifs) qui vont être mis en contact avec les cellules. Les locaux doivent donc être « situés, conçus, construits, adaptés et entretenus de façon à être en adéquation avec les opérations à effectuer » selon les règles de bonnes pratiques en thérapie cellulaire (BPTC) [10]. Il convient notamment de réaliser les étapes de préparation dans des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) :

- De niveau de propreté approprié
- Comportant un système de maintien et suivi de la température (+21°C +/- 3°C).
- Limitant les risques de contamination (flux produits, matériel, déchets)
- Schéma aéraulique ne présentant pas de risque de contamination
- Conception limitant le risque de contamination : faux plafonds scellés, mobilier et éclairage limitant les anfractuosités, plafond, sol et murs lessivables...
- Etre conforme à la norme en vigueur concernant le niveau de concentration microbiologique et particulaire.

L'EFS de Nantes fait partie des unités de thérapie cellulaire autorisées par l'ANSM selon l'article L1243-2 du code de la santé publique (CSP) à réaliser la préparation, conservation, distribution et cession de CSH et cellules mononucléées. Il est donc considéré que l'UIC de Nantes possède l'environnement adapté et conforme à l'application des règles de BPTC pour la manipulation de ces produits, et donc potentiellement le produit évoqué ici, dérivé de cellules mononucléées.

Plus précisément pour la réalisation de manipulations évoquées pour ce produit, cette unité possède une ZAC de classe D comportant des postes de sécurité microbiologiques (PSM) correspondant à une classe A. Les manipulations les plus critiques pour la stérilité

pourront être réalisées sous ces PSM de type II (modèle Thermo Scientific, MSC Advantage). Ils génèrent un flux d'air unidirectionnel (laminaire) de classe A à vitesse homogène comprise entre 0.36 et 0.54 m/s, conformément aux normes EN 12649.

Afin de réaliser les étapes de stimulation et de sécrétion d'IFN γ par les L_T, l'UIC devra également être doté d'un incubateur permettant un maintien à la température de 37°C et un suivi du niveau de CO₂ (5-7.5%) [6]. Un modèle comme le Thermo Scientific, Heracell 150i présent dans un autre service de l'EFS de Nantes pourrait être utilisé.

Pour les étapes de maintien au froid à la température de 0°C, un milieu froid doit être créé. Il est possible par exemple d'utiliser un système type Alcal® (société ISOS), qui permettent de thermoréguler les poches en contact avec ce système portatif [87].

3.4. Matériel :

Il est listé ici le matériel nécessaire aux différentes étapes du procédé. (cf. Tableau 7 : Matériel process). Ils possèdent tous un marquage CE homologuant le respect des normes intrinsèques à ces éléments. Ils nécessitent également une qualification, réalisée au sein de l'UIC pour le matériel déjà présent. Leur fonction et utilisation est décrite dans la partie méthode.

- CliniMACS® Plus Instrument (Miltenyi Biotec)
- Système pour connexion stérile (Terumo, TSCD-II)
- Soudeuse pour tubulure PVC (Fresenius NPBI, Composeal Mobilea)
- Presse manuelle : extraction du surnageant (Fenwal)
- Centrifugeuse (Jouan, KR4i)
- Agitateur pour poches (Heidolph, Polymax 1040)
- Balance (Sartorius, 1403 MP8)
- Pince à stripper (Fisher Bioblock Scientific)
- Poches de maintien à 4°C (Isos, Alcal®)
- Clamps

3.5. Matière :

Les éléments décrits ici correspondent aux différentes matières premières nécessaires à la production des lymphocytes anti-CMV. Il est présenté séparément le « principe actif » présent dans les cellules du donneur et les réactifs et milieux de culture nécessaire à l'activation et à l'isolement des cellules d'intérêts.

3.5.1. Cellules du donneur :

Afin d'obtenir le produit escompté par la méthode présentée par la suite, un minimum de conditions de départ sont nécessaire concernant les cellules prélevées chez le donneur :

- Prélèvement de cellules mononucléées périphériques
- Donneur avec sérologie CMV+ : indicateur de la présence du virus et donc des Lymphocytes T anti-CMV. Les cellules d'intérêt (L_T anti-CMV) ne sont présentes que chez les patients ayant une sérologie positive pour le CMV.
- Donneur compatible avec receveur au niveau HLA (identique ou non avec le donneur de CSH) : nécessaire à l'activité et sécurité du produit [5].
- $\geq 10^9$ cellules mononuclées : pour permettre la sélection d'une quantité suffisante de cellules d'intérêts, le procédé de production choisi ici utilise des quantités de réactifs permettant de manipuler 10^9 cellules [47].
- Stérile
- Identifié : pour assure la traçabilité donneur / receveur

Les autres paramètres étudiés chez le donneur et le receveur sont compilés dans le Tableau 8 : Contrôles du donneur" et le Tableau 9 : Contrôles du receveur". Ce prélèvement pourrait être réalisé au Centre de Santé Médical de l'EFS-Nantes, en utilisant un protocole proche de celui utilisé pour le prélèvement de DLI (donor lymphocyt infusion). Ce prélèvement permet en effet d'obtenir le même type de cellules que recherchées ici.

3.5.2. Produits entrant en contact avec les cellules

Selon les règles de Bonnes Pratiques [10], « Les PTA et les autres produits (ex. : membranes de nitrocellulose, tubes, boîtes de pétri) entrant en contact avec les cellules sont validés et satisfont à des spécifications et caractéristiques documentées. S'ils répondent à la définition du dispositif médical, ils sont conformes aux exigences des articles L. 5211-3 et suivants du code de la santé publique et R. 5211-1 du même code. Si ces produits répondent à la définition de PTA, ils doivent respecter les dispositions des articles R. 1261-1 à R. 1261-9 du même code ».

Les éléments présentés ici ont donc été choisis en prenant compte de la réglementation [10], les recommandations du fournisseur du kit de sélection [47] et en comparant les produits utilisés par les différentes équipes ayant déjà utilisé ce type de procédé (Tableau 10 : publications présentant l'utilisation de la colonne de séparation magnétique CliniMacs (Miltenyi Biotec) pour la production de différents types de CTL. Antigènes, temps de contact pour l'activation et milieux de cultures utilisés.

Milieux liquides en contact avec les cellules:

- RPMI 1640 : sans glutamine, sans HEPES, sans rouge de phénol, sans ATB, sans pyruvate de sodium. Ce milieu de culture contient les éléments essentiels à la survie des cellules pour une culture cellulaire de courte durée (16h).
- Sérum AB humain ou de sérum autologue utilisé pour les préparations de milieu de culture à 10%, 2% et 0.5% : contient les éléments nutritifs nécessaires à la survie des cellules
- CliniMACS PBS/EDTA buffer (Miltenyi Biotec): milieu permettant la conservation des cellules

Réactifs :

- MACS GMP HCMV pp65 – recombinant protein (Miltenyi Biotec)
- CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) (Miltenyi Biotec):
- Anticorps anti-CD45 conjugué à Anticorps anti-IFN γ .
- Anticorps anti-IFN γ conjugué à billes magnétiques.

Consommables :

- CliniMACS tubing set (Miltenyi Biotec)
- Poches de transfert 600ml (MacoPharma)
- Poche de culture cellulaire 100ml perméable aux gaz: Cell Expansion Bag (Miltenyi Biotec) : ces poches ont pour particularité de pouvoir augmenter leur volume utile sans avoir à réaliser de manipulation de transfert. L'expansion cellulaire en poche par rapport à expansion cellulaire en flasque est identique en termes de multiplication cellulaire et d'activité. Ceci car les cellules en multiplication sont en suspension et non en adhérence [71].
- Pre system filter (Miltenyi Biotec)

Des informations complémentaires sont présentées en annexes (Tableau 6 : Matières premières process) : fournisseur, prix, mode de stérilisation... Il est ainsi possible d'estimer le coût d'obtention de lymphocytes T anti-CMV à plus de 5000€ concernant matières premières et consommables. Les principaux postes de dépense sont le prélèvement de cellules mononucléées (1315€), le kit de tubes utilisés sur la colonne CliniMACS (1311€) et les protéines recombinantes pp65 nécessaire à la réactivation des cellules (3230€).

3.6. Méthode :

3.6.1. Production

La méthode de production s'articule en 7 étapes principales résumées ici :

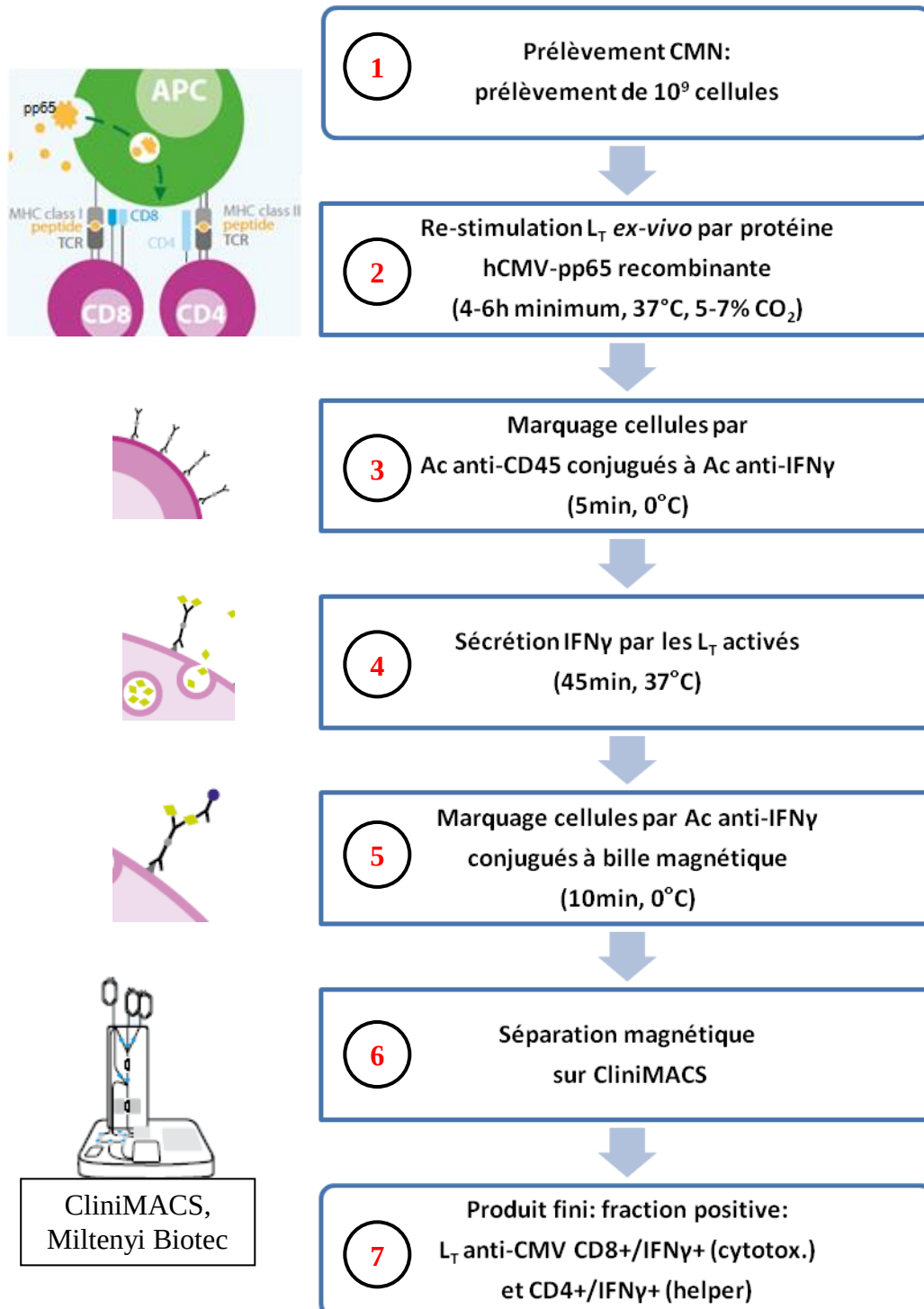


Figure 17: Principales étapes de production de lymphocytes T anti-CMV par sélection immunomagnétique

Le procédé de sélection des CTL anti-CMV est développé par l'équipe de l'UMR 892. La méthode de tri Miltenyi repose sur le principe de la capture des cellules T qui produisent de l'interféron gamma après une stimulation peptidique. Ce procédé est proche d'être standardisé en conditions « recherche » avec des rendements satisfaisants, supérieurs à 75%. La pureté varie en fonction du nombre de cellules de départ et du pourcentage de précurseurs. Ces données obtenues par l'UMR 892 doivent être confirmées et adaptées lors du transfert technologique sur l'automate Miltenyi.

Cette technique ne tue pas les cellules mais concentre les cellules mortes dans la fraction positive, car ces dernières fixent les anticorps de sélection de façon non spécifique. La viabilité cellulaire dosée est donc diminuée [76]. Le volume final du produit est de l'ordre de 50mL. L'ensemble du processus de la réception des cellules à la cryopreservation peut être effectué en moins de 24h.

1) Préparation du prélèvement: Prélèvement de 10^9 CMN sur le prélèvement initial.

1. Transférer au maximum 10^9 cellules du prélèvement dans une poche transfert 600mL.
2. Ajouter du milieu de culture froid (4°C) jusqu'à atteindre 500mL.
3. Centrifuger à 200G pendant 10 minutes sans freinage.
4. Eliminer le surnageant en utilisant la presse manuelle après avoir connecté par connexion stérile la poche de transfert à une autre poche de transfert 600ml vide.
5. Effectuer un second nettoyage en répétant les étapes 2 à 4.
6. Remettre en suspension les cellules dans un volume final de 100ml de milieu de culture contenant 10% de sérum AB. Obtention d'une concentration $\leq 10^7$ cellules/ml.
7. Prélever 1ml pour les contrôles qualité ultérieurs (contrôle négatif).

2) Re-stimulation ex-vivo des L_T

1. Transférer les 100ml de cellules dans une poche de culture perméable aux gaz.
2. NB : la densité optimale est de $0.5-1 \times 10^7$ cellules/cm² et 10^7 cellules/ml.
3. Ajouter 1ml ($1/100^e$ du volume total) d'antigène pp65 (MACS GMP HCMV pp65-recombinant protein) à l'aide d'une seringue.
4. Laisser incuber la poche de culture cellulaire à 37°C et 5-7% de CO₂ entre 4 et 6 heures. NB : temps optimal = 6h

3) Marquage des cellules par anticorps anti-CD45 conjugué à anticorps anti-IFN γ .

1. Transférer les cellules dans une poche de transfert de 600ml.
 2. Remplir la poche jusqu'à 500ml avec du milieu de culture froid contenant 2% de sérum AB.
 3. Centrifuger les cellules à 300G pendant 10 minutes sans freinage puis éliminer le surnageant comme vu précédemment.
 4. Ajuster le volume à 10ml.
 5. Ajouter 7.5ml d' « IFN-gamma Catchmatrix Reagent » au culot cellulaire à l'aide d'une seringue.
 6. Remettre en suspension les cellules et incuber pendant 5 minutes avec les Alcal®
- NB : Cette première incubation permet la fixation de l'anticorps anti-CD45 sur les leucocytes. La température basse (4°C) limite la sécrétion d'IFN par les cellules stimulées.

4) Sécrétion d'IFN γ par les L_T activés

1. Préparer 3 nouvelles poches de transfert avec 125 ml de milieu de culture chaud (37°C) contenant 10% de sérum AB.
2. Ajouter 500ml de milieu de culture chaud (37°C) contenant 10% de sérum AB à la poche contenant les cellules.
3. Distribuer 125ml de la suspension cellulaire résultante dans chacune des trois nouvelles poches.
4. Ajouter 125ml de milieu de culture chaud (37°C) contenant 10% de sérum AB à la poche de cellule « original ». On obtient alors 4 poches de transfert avec 250ml de suspension de cellules à 10^6 cellules/ml.

5. Incuber les cellules pendant 45 minutes à 37°C, avec une rotation continue lente (max. 50 RPM).

NB : Le facteur de dilution important ainsi que l'agitation constante permettent de séparer les cellules les unes des autres afin que l'IFN sécrété par une cellule se fixe sur l'anticorps bivalent anti-CD45/anti-IFN déjà fixé sur cette même cellule.

6. Ajouter au moins 250ml de « CliniMACS PBS/EDTA Buffer » froid contenant 0.5% de sérum AB à chaque poche. Laisser les cellules refroidir en les plaçant sur les Alcal® pendant 10 minutes.
7. Centrifuger les cellules à 300G sans frein pendant 10 minutes à 4°C puis éliminer le surnageant.
8. Remettre en suspension les cellules et les laver avec du « CliniMACS PBS/EDTA Buffer » froid contenant 0.5% de sérum AB :
 - Attacher une des poches à la poche contenant le tampon PBS/EDTA par connexion stérile.
 - Après avoir détaché la poche de tampon de la poche de transfert contenant les cellules, connecter cette poche à une autre poche de transfert contenant des cellules et recombine les deux suspensions.
 - Répéter cette procédure jusqu'à ce que les suspensions de cellules des 4 poches de transfert soient recombinaées.
 - Centrifuger les cellules à 300G sans freinage pendant 10 minutes à 4°C.
9. Conserver un échantillon pour évaluer le % de lymphocyte T IFN+ en haut de colonne, avant enrichissement sur colonne.

5) Marquage des cellules par anticorps anti-IFN γ conjugués à billes magnétiques

1. Eliminer le surnageant et ajuster le volume à 10ml.
2. Ajouter 7.5ml d' « IFN-gamma Enrichment Reagent » au culot cellulaire à l'aide d'une seringue.
3. Remettre les cellules en suspension et incuber pendant 15 minutes avec les Alcal® Remplir la poche avec du tampon PBS/EDTA froid et centrifuger à 300G sans frein pendant 10 minutes à 4°C.
4. Eliminer le surnageant et remettre en suspension les cellules dans 100ml de tampon PBS/EDTA froid.

6) Séparation sur colonne, à l'aide du dispositif CliniMacs (Miltenyi Biotec)

Pour le réglage du CliniMACS Plus Instrument, le choix du programme de séparation et l'installation des tubes (CliniMACS tubing Set), suivre les instructions détaillées dans le manuel utilisateur du CliniMACS Plus Instrument [47].

- Connecter la poche de cellules et la poche contenant le tampon PBS/EDTA contenant 0.5% de sérum AB aux tubes du CliniMACS tubing set.
- Séparer les cellules en utilisant le programme ENRICHMENT 3.2.
- Les cellules actives sont récupérées dans la poche de transfert.

7) Récupération des Fractions positive et négative

1. A la fin de la procédure, récupérer la fraction positive enrichie en lymphocytes T IFN γ + dans une poche de transfert puis lavée par centrifugation (300 g, 10 minutes, +4°C) avec 100 ml de tampon PBS/EDTA contenant 0.5% de sérum AB à +4°C.
2. Suivre la même procédure pour la fraction négative.
3. Prélever 1mL sur chaque fraction afin de réaliser l'ensemble des contrôles qualité du produit fini (numération, viabilité, cytométrie en flux, bactériologie, amplification des cellules pour contrôles qualité fonctionnels).
4. Une étape de cryopreservation peut-être ajoutée si nécessaire

3.6.2. Cryoconservation

Les cellules obtenues peuvent être divisées en plusieurs doses de manière aseptique en poches correspondant aux quantités nécessaires pour le patient. La congélation pourra être réalisée en azote gazeux à l'aide du congélateur programmable de type Freezal (ALS) déjà utilisé à l'UIC de Nantes pour la cryoconservation d'autres types de cellules comme les CSH.

3.6.3. Contrôle Qualité

Contrôles sur le prélèvement (cf. Tableau 11 : Contrôle qualité du prélèvement :) :

Les tests sur le prélèvement sont identiques aux tests effectués actuellement pour les DLI (CMN) à l'EFS de Nantes, hormis l'ajout d'un test de stérilité initiale étant donné la durée importante des manipulations sur les cellules :

- Identification donneur (receveur)
- Stérilité produit cellulaire (Ph. Eur. 2.6.27)
- Numération (automatique et manuelle) : cellules nucléées, plaquettes, globules rouges
 - Par cytométrie de flux : CD45+, CD3+, Viabilité cellulaire (test au 7-AAD)

Contrôles in process (cf. Tableau 12 : Contrôle qualité in process)

Ces différents contrôles permettent le suivi de la sélection et du rendement du processus :

- Après stimulation :
 - Numération : cellules nucléées, plaquettes, globules rouges
 - par cytométrie de flux : CD45+, CD3+, Viabilité cellulaire (test au 7-AAD)
- Avant passage sur la colonne : Identité et pureté:
 - Numération : cellules nucléées, plaquettes, globules rouges
 - par cytométrie de flux : CD45+, CD3+, IFN γ +, Viabilité cellulaire.

Contrôles du produit fini (cf. Tableau 13)

- Identification donneur/receveur
- Stérilité (d'après les recommandations de la Pharmacopée Européenne)

- Identité et pureté:
 - Numération : cellules nucléées, plaquettes, globules rouges
 - par cytométrie de flux :
 - paramètres à étudier : CD45+, CD3+, IFN γ +, CD4+, CD8+, CD14+, Viabilité cellulaire.
 - Cellules à identifier et quantifier :
 - CD8+/IFN γ + (quantité, %, concentration)
 - CD4+/IFN γ + (quantité, %, concentration)
- Activité : Contrôles qualité fonctionnels réalisés sur cellules amplifiées (1-4 semaines) :
 - Test de cytotoxicité : capacité à détruire les cellules infectées par CMV.
 - Dosage des cytokines intracellulaires : conservation de la capacité à sécréter de l'IFN γ et IL-2 après nouvelle stimulation par antigène pp65 (perméabilisation par Brefeldine A).
 - Test de prolifération : capacité de multiplication en présence de l'antigène
 - Test de l'alloréactivité résiduelle : Culture mixte lymphocytaire. D'après certaines publications, du fait d'une diminution importante de l'alloréactivité par ce procédé de production [76], ce test ne s'avère pas forcément utile [88]. D'autres indiquent le contraire, et certains produit n'ont pu être administré aux patients car trop alloréactifs [69].

3.7. Main d'œuvre:

Personnel formé et habilité à l'usage :

- du CliniMACS® Plus Instrument
- de la presse manuelle pour extraction du plasma
- de la soudeuse pour connexion stériles
- de la soudeuse pour souder tubulure
- de la centrifugeuse
- des balances et pesée

Personnel formé et habilité :

- au travail sous PSM
- au comportement en ZAC
- à l'habillement en ZAC

Temps de travail estimé:

Etape	Temps de travail (h)
Préparation des milieux liquides	1
Prélèvement de 10^9 CMN sur le prélèvement initial.	2
Re-stimulation ex-vivo des L_T par la protéine hCMV-pp65 recombinante.	1 (4 à 16h de stimulation)
Marquage des cellules par anticorps anti-CD45 conjugué à anticorps anti-IFNγ.	1
Sécrétion d'IFNγ par les L_T activés	2,5
Marquage des cellules par anticorps anti-IFNγ conjugués à billes magnétiques	1
Séparation sur colonne, à l'aide du dispositif CliniMacs	2
Récupération de la fraction positive	1
Total	11,5

Le schéma le plus adapté aux contraintes horaires des techniciens passent par des manipulations sur 2 jours :

- J1 : préparations des milieux, réception et prélèvement des 10^9 cellules.
- Nuit entre J1 et J2 : stimulation 14-16h des cellules
- J2 : marquage et séparation des cellules.

3.8. Bilan de l'analyse du procédé

L'ensemble des éléments présentés ici permettent de mettre en évidence les points importants du processus de production. Les conditions, le matériel et les consommables sont compatibles pour la production de grade clinique. En effet, un soin particulier a été porté aux spécifications des réactifs, milieux... Les différents éléments entrant en contact avec les cellules portent un marquage CE en tant que DM ; la protéine hCMV-pp65 est produite en condition GMP par Miltenyi Biotec ; le processus se déroule en zone à atmosphère contrôlée...

L'immunothérapie adoptive, avec le développement de techniques rapides et de grade clinique fait maintenant partie des options thérapeutiques des infections post-greffes. Nous avons pu montrer ici que la production de lymphocytes T anti-CMV en condition GMP (Good Manufacturing Practice), grâce au système CliniMACS de Miltenyi était réalisable dans un contexte clinique.

Comme le met en évidence la Figure 18 en annexe présentant le process du donneur au receveur, celui-ci peut rapidement s'implanter au sein du circuit de thérapie cellulaire mis en place autour et au sein de l'UIC.

En effet, toutes les étapes en amont (sélection du donneur, prélèvement des CMN, transport, réception et enregistrement) et en aval (congélation, décongélation, transport, injection au receveur) sont maîtrisées car elles s'inscrivent comme des activités de routine de l'UIC et des structures adjacentes. Une étape de développement et d'adaptation de certaines méthodes de contrôle qualité devra être mise en place car ce procédé de production implique des méthodes de contrôles spécifiques (dosage par cytométrie de flux non utilisés en routine, activité cytotoxique...).

De plus, la grande majorité des éléments matériels et de matières premières sont à disponibilité immédiate. Cependant, le « CliniMacs », pièce centrale du processus n'est pas encore disponible à l'UIC de Nantes.

Un des autres points forts de cette méthode est qu'elle est rapide et permet en moins de 24 heures [54] l'obtention du produit fini, sans étape de culture à proprement parler. On diminue ainsi le délai entre le diagnostic de maladie à CMV et le traitement.

Elle décrit l'obtention d'une thérapie cellulaire à la demande en un délai court sans période d'expansion des cellules. Cette méthode s'inspire de plusieurs publications sur ce procédé (Tableau 10 : publications présentant l'utilisation de la colonne de séparation magnétique CliniMacs (Miltenyi Biotec) pour la production de différents types de CTL), notamment les équipes de Rooney et Einsele [5] [6].

Conclusion

Encore peu utilisée, l'immunothérapie adoptive à l'aide de CTL se situe pour le moment en complément des traitements médicamenteux classiques. Elle pourrait cependant venir lui prêter main forte voire la remplacer dans les cas de résistance aux antiviraux. De plus, son coût d'obtention est en train de diminuer.

Elle ouvre également la voie au traitement d'autres pathologies, grâce à la caractérisation moléculaire d'antigènes spécifiques tumoraux et de la production de réactifs spécifiques permettant d'identifier et d'isoler les lymphocytes T qui reconnaissent ces antigènes [5]. Cette potentialité d'activité à d'autres pathogènes (EBV [89], ADV [90], Aspergillus [91]... (cf. Tableau 10) voire multi-virus [46], permet d'envisager une forte croissance de l'immunothérapie adoptive à moyen-long terme.

La possibilité de congeler, créer une banque de CTL et d'utiliser ces produits pour plusieurs patients compatibles est une autre étape, que certaines équipes ont déjà franchi [77]. Ces banques permettent d'avoir à disposition des cellules « prêtes à l'emploi » et donc une réactivité encore plus importante.

Ces différentes perspectives permettent donc d'envisager le développement rapide de ces produits. Au sein de l'EFS, le procédé de tri cellulaire par CliniMACS n'a finalement pas été retenu : seules les étapes d'expansion cellulaire en poche d'expansion seraient conservées. Le reste du procédé resterait identique à ce qui a été présenté précédemment. Le temps de production passe cependant à 18 jours, contre 2 précédemment car il y a désormais deux phases de stimulation/expansion pour permettre l'obtention de quantités plus importantes de cellules d'intérêts.

Le projet se porte désormais vers la création d'une banque de CTL obtenu à partir de donneurs homozygote sur un certains nombre d'allèles et nécessite donc la production de quantités plus importantes de cellules. La création d'une banque à partir de ces allèles confère une couverture de 80% de la population caucasienne. Le projet comprend également la transposition du procédé au sein de l'ABG et l'achat d'un PSM dédié à la thérapie cellulaire pour une des suites de production de ce site pharmaceutique.

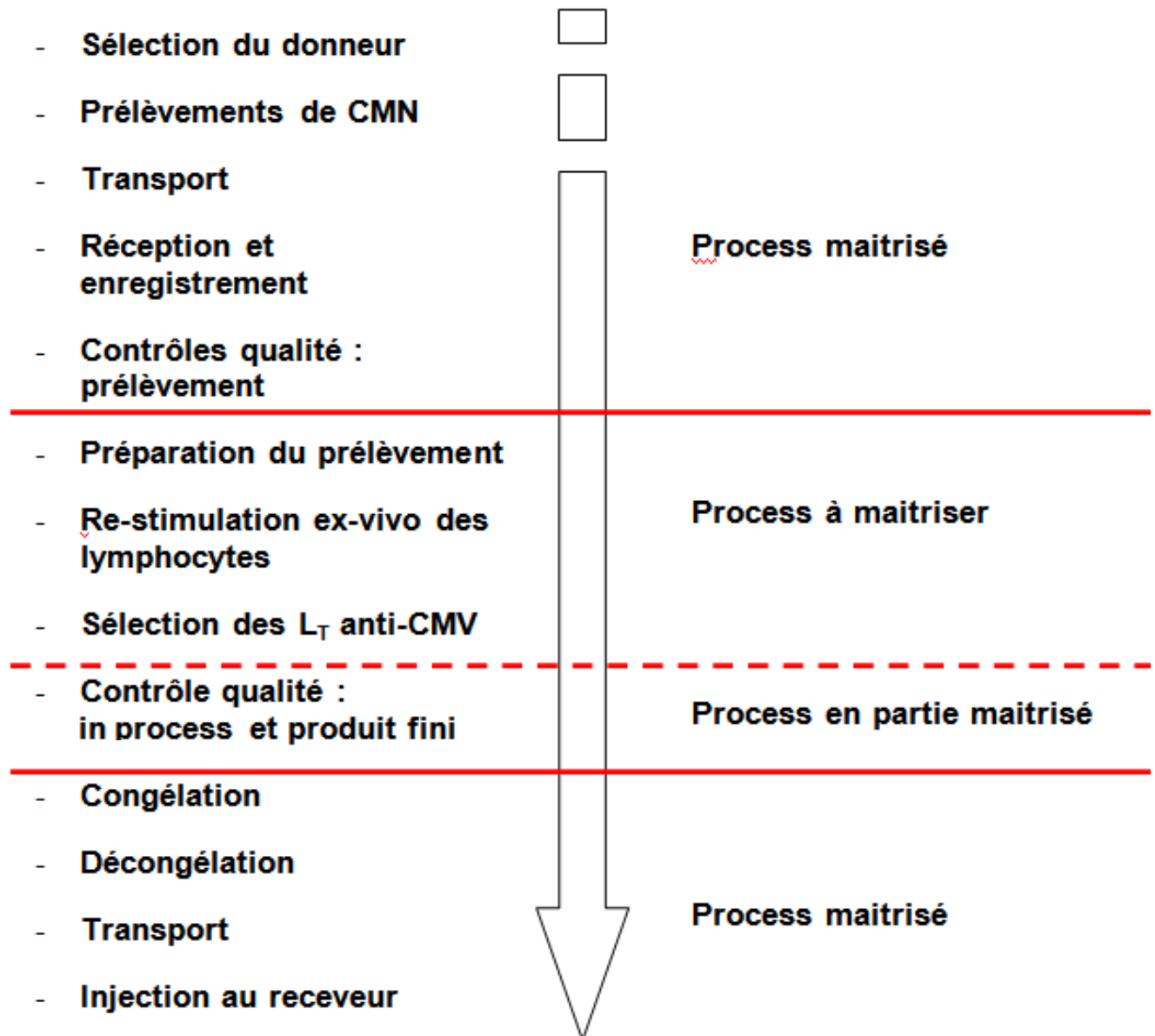
Une nouvelle indication des CTL dirigés sera également testée : comme adjuvant dans le traitement du glioblastome, après résection chirurgicale de la tumeur suivi d'une injection intracrânienne de CTL.

Suite à l'autorisation par l'ANSM en février 2014 d'accorder le statut d'établissement pharmaceutique pour la fabrication de produit de thérapie cellulaire, Atlantic Bio GMP, peut libérer ces produits avec le statut de médicaments. Cette unité peut désormais proposer aux équipes souhaitant produire ces MTI (médicaments de thérapie innovante) la fabrication d'unités nécessaires aux phases cliniques I et II. Il possède déjà le statut d'établissement pharmaceutique depuis 2012 pour la Fabrication de produits de thérapie génique.

L'EFS maîtrise actuellement les étapes en amont et en aval de la production des CTL (Figure 18). En mettant en place la production avec éléments présentées dans cette thèse, l'EFS possédera tous les éléments nécessaires à l'atteinte de l'objectif de production en condition pharmaceutique des CTL pour des études cliniques.

Figure 18 : Place du procédé dans le circuit de thérapie cellulaire de Nantes

DU DONNEUR AU RECEVEUR:



Annexes

Tableau 5 : Synthèse des traitements antiviraux utilisés contre le CMV:

Molécule	Mode d'actions	Administration	Indications	Effets indésirables	Notes
Aciclovir et prodrogue	1, 2	VO (IV possible)	Prévention des infections à CMV	Céphalées, nausées et vomissement	Moins actif sur le CMV que sur les autres Herpes virus
Ganciclovir et prodrogue	1, 2	IV (biodisponibilité orale <10%) VO pour prodrogue	Rétinite à CMV, infection à CMV chez l'immunodéprimé en 2 ^{ème} intention	Toxicité hématologique : neutropénie, thrombopénie.	
Foscarnet	1, 3	IV	Infection à CMV chez le sujet immunodéprimé, rétinite à CMV en 2 ^{ème} intention	Néphrotoxicité	
Cidofovir	1	IV	En 2 ^{ème} intention : infection à CMV chez le sujet immunodéprimé, rétinite à CMV résistante aux autres traitements	Néphrotoxicité	

1 : Inhibition de l'ADN polymérase virale

2 : Incorporation à l'ADN viral

3 : Inhibition de la transcriptase inverse

Tableau 6 : Matières premières process

Type	Produit		Fournisseur	Référence	Quantité	Prix/unité	Remarques	Stérilisation
Consommables divers	CliniMACS tubing set		Miltenyi Biotec	161-01	1	1311	CE	R ?
	Poche de transfert 600ml		MacoPharma	VSE 4002XA	10	2.83	CE 0459	R
	Poche de culture cellulaire 100ml perméable aux gaz		Miltenyi Biotec	200-074-101	1	??	CE	R ?
	Pre system filter		Miltenyi Biotec	181-01	1	??	CE	EO ?
	Samplings (sites d'injections)		Terumo	TC*MP	4	0.50 (25€ / 50)	CE	EO
	Seringues	1ml	BD	300013	1		CE 0318	R
		10ml	BD	302188	4		CE 0318	EO
		50ml	B.Braun	4617509F PZN-0570068 Luer Lock	2		CE 0123	EO
	Aiguilles d'aération (prises d'air)		B.Braun	4190050	5	44€/100	CE 0197	EO
	Aiguilles de transfert		BD	305180	7	28€/100	CE 0050	R

Type	Produit		Fournisseur	Référence	Quantité	Prix	Remarques	Stérilisation
Milieux liquides	RPMI 1640 w/o RP w/o HEPES w L-Glutamine		Sigma-Aldrich	R8758	2.5L	51.30€ pour 6*500ml	test endotoxine	Filtration stérilisante
	Sérum AB humain		EFS-IDF, site de Rungis	NB : enregistrement E- 828 de l'EFS-IDF	135mL	135.98€ /200 mL	Frais congelé à -35°C	Répartition stérile ?
	PBS/EDTA Buffer		Miltenyi Biotec	700-25	3L	61.43€ /poche de 1L	CE (0123 ?)	Certificate de stérilité
Réactifs	protéine recombinante pp65 MACS GMP HCMV pp65-Recombinant Protein		Miltenyi Biotec	130-093-435	1mL (1 unité)	3230€ pour l'activation de 10 ⁹ cellules	Pour process de culture cellulaire ex-vivo	Certificate de stérilité
	CliniMACS Cytokine Capture System (IFN γ)	Anticorps anti-CD45 conjugué à Anticorps anti-IFN γ	Miltenyi Biotec	130-091-329	7.5mL (1 unité)	255.4€ (2554€ pour 100 séparation)	CE (0123?)	Certificate de stérilité
		Anticorps anti-IFN γ conjugué à billes magnétiques			7.5mL (1 unité)			
Source de CTL	Prélèvement de cellules mononucléées : prélèvement et contrôle qualité.		EFS Nantes		Par prélèvement	1315€		

Tableau 7 : Matériel process

Matériel	Fournisseur (modèle, ref)	Remarques
CliniMACS® Plus Instrument	Miltenyi Biotec (151-01)	Matériel non disponible à l'UIC-Nantes Marquage CE pour usage clinique
Système pour connexion stérile	Terumo (TSCD-II)	
Soudeuse pour tubulure PVC	Fresenius NPBI (Composeal Mobilea)	Marquage CE comme dispositif médical
Centrifugeuse	Jouan (KR4i)	
Presse manuelle	Fenwal	
Balance	Sartorius (1403 MP8)	
Pince à stripper	Fisher Bioblock Scientific	
Alcal (4°C, 20*14cm)	ISOS	
Clamps		
Agitateur pour poches	Heidolph, Polymax 1040	

Tableau 8 : Contrôles du donneur

Paramètre biologique contrôlé	Méthode de contrôle	Résultat attendu
sérologie CMV /CHU Nantes	Dosage IgG CMV par méthode de Liaison DiaSorin	Positif (>0.6UI/ml)
Sérologie HIV 1-2 /CHU Nantes	ELISA (Architect, Abbott) Antigène P24 (VIDAS, Biomérieux)	Négatif Négatif
Sérologie HTLV 1-2 /CHU Nantes	Architect, Abbott	Négatif
Sérologie de l'hépatite B /CHU Nantes	Antigène HBs Anticorps HBs Anticorps HBc	Négatif (sauf dérogation) Négatif (sauf dérogation, ou positif si Ag HBs et Ac HBc négatif) Négatif (sauf dérogation)
Sérologie de l'hépatite C /CHU Nantes	Architect, Abbott	Négatif (sauf dérogation)
Sérologie EBV /CHU Nantes	Liaison DiaSorin	A titre indicatif
Sérologie Syphilis /CHU Nantes	VDRL Latex, OXOID TPHA/ELISA, BIO-RAD	A titre indicatif
Sérologie toxoplasmose /CHU Nantes	IgG et IgM	A titre indicatif
Groupe HLA /EFS Nantes ou centre donneur	??	Compatible avec le receveur
Groupe ABO Rhésus phénotype Kell, recherche d'agglutinines irrégulières /EFS Nantes ou centre donneur	??	Pas de spécifications, mais attitude à adopter différente si incompatibilité majeur ou mineur
DGV		

Tableau 9 : Contrôles du receveur

Paramètre biologique contrôlé	Méthode de contrôle	Résultat attendu
Groupe HLA /EFS Nantes ou centre donneur	Génotypage	Compatible avec le receveur
Groupe ABO Rhésus phénotype Kell, recherche d'agglutinines irrégulières /EFS Nantes ou centre donneur	Immuno-hématologie	Pas de spécifications, mais attitude à adopter différente si incompatibilité majeur ou mineur

Tableau 10 : publications présentant l'utilisation de la colonne de séparation magnétique CliniMacs (Miltenyi Biotec) pour la production de différents types de CTL. Antigènes, temps de contact pour l'activation et milieux de cultures utilisés

Cible	Source d'antigène	Temps de contact	milieu de culture	Référence	Année
CMV	Pp65 couplé à Streptamer CMH-I	>12h	?	[92]	2014
CMV	peptides: PepTivator CMV	12-16h (overnight)	RPMI1640 10%AB	[54]	2011
CMV	protéine: recombinant pp65	12-16h (overnight)	RPMI1640 10%AB	[54]	2011
ADV	peptide: HAdV hexon protein-spanning peptide pool	6h	RPMI1640 10%AB	[90]	2010
CMV	protéine: recombinant pp65	16h	RPMI1640 10%AB	[5]	2010
EBV	peptide: EBV peptide mix	12h	RPMI1640 10%AB	[89]	2010
Aspergillus	water soluble cellular extract	12-16h	X-vivo 10 medium 10% heat-inactivated GMP human serum	[91]	2009
ADV	peptides: PepTivator-ADV5 Hexon	6h	RPMI1640 10%AB	[76]	2009
CMV	peptide: peptide pool	6h	?	[56]	2009
ADV et CMV	virus recombinant, monocyte presenting pp65	16-18h	RPMI1640 45 % Click's medium 5%AB	[46]	2008
CMV	protéine : recombinant pp65	12-16h (overnight)	?	[6]	2007
ADV	protéine: adenoviral antigen type C	16h	RPMI1640 10%AB	[93]	2006
CMV	Pp65 recombinant	16h	RPMI1640 10%AB	[57]	2004
CMV	peptides: HLA-restricted CMV synthetic peptides from pp65 and IE	12-16h (overnight)	RPMI1640 10%AB 500 IU/mL penicillin G, and 500 g/mL streptomycin	[55]	2004
CMV	CMV lysate	10 jours	RPMI1640 10%AB	[43]	2002

Tableau 11 : Contrôle qualité du prélèvement :

Test		Méthode	Spécifications ou résultats
Stérilité /EFS Nantes		Ph.Eur. 2.6.27. Contrôle microbiologique des produits cellulaires	Négatif
Numération /EFS Nantes	Leucocytes	Ph.Eur. 2.7.29. (automate et manuelle)	> 10 ⁹
	Plaquettes	(automate et manuelle)	A titre indicatif
	Globules rouges	(automate et manuelle)	A titre indicatif
Dosage des CD45+ /EFS Nantes		Ph.Eur. 2.7.24 Cytométrie en flux	Ph.Eur. 2.7.23. Numération des cellules CD34+ et CD45+ des produits hématopoïétiques > 10 ⁹
Dosage des CD3+ /EFS Nantes			Cytométrie de flux A titre indicatif (suivi de purification)
Viabilité cellulaire /EFS Nantes			Ph.Eur. 2.7.29. Numération et viabilité des cellules nucléées >90%

Tableau 12 : Contrôle qualité in process

Test		Méthode	Spécifications ou résultats
Numération /EFS Nantes	Leucocytes	Ph.Eur. 2.7.29. (automate et manuelle)	10 ⁹ +/- 20%
	Plaquettes	(automate et manuelle)	A titre indicatif
	Globules rouges	(automate et manuelle)	A titre indicatif
Dosage des CD45+ /EFS Nantes		Ph.Eur. 2.7.24 Cytométrie en flux	Ph.Eur. 2.7.23. Numération des cellules CD34+ et CD45+ des produits hématopoïétiques 10 ⁹ +/- 20%
Dosage des CD3+ /EFS Nantes			A titre indicatif (suivi de purification)
Viabilité cellulaire /EFS Nantes			Ph.Eur. 2.7.29. Numération et viabilité des cellules nucléées >90%
Dosage IFN γ + (avant séparation magnétique) /EFS Nantes			A titre indicatif (suivi de purification)

Tableau 13 : Contrôle qualité du produit fini

Test		Méthode	Spécifications ou résultats
Stérilité /EFS Nantes		Ph.Eur. 2.6.27. Contrôle microbiologique des produits cellulaires	Négatif
Identité et pureté /EFS Nantes	Viabilité	Ph.Eur. 2.7.29.	>70%
	CD45+	Ph.Eur. 2.7.23.	>10 ⁸
	CD3+		>30%
	CD8+	Ph.Eur. 2.7.24 Cytométrie en flux	CD8+/IFN γ + CD4+/IFN γ + >5%, >10 ⁵ , >10 ⁴ /kg
	CD4+		
	IFNγ+		
	CD14+		
Activité /??	Cytotoxicité	Réalisés sur cellules amplifiées (1-4 semaines)	Capacité à détruire les cellules infectées par CMV
	Prolifération		Capacité de multiplication en présence Ag pp65
	Sécrétion cytokines		Conservation capacité sécrétion IFN γ et IL-2 après nouvelle stimulation par pp65
	Alloréactivité		Culture mixte lymphocytaire

NB : en rouge = éléments non maîtrisés

Bibliographie

- [1] K. Mantripragada, J. L. Reagan, P. J. Quesenberry, et L. D. Fast, « Advances in cellular therapy for the treatment of leukemia », *Discov. Med.*, vol. 17, n° 91, p. 15-24, janv. 2014.
- [2] « Greffe de moelle osseuse : Des progrès significatifs obtenus depuis 10 ans par l'Agence de la biomédecine et les professionnels de santé pour le bénéfice des malades - Agence de la biomédecine ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.agence-biomedecine.fr/Greffe-de-moelle-osseuse-Des>. [Consulté le: 08-nov-2014].
- [3] A. Schmitt, T. Tonn, D. H. Busch, G. U. Grigoleit, H. Einsele, M. Odendahl, L. Germeroth, M. Ringhoffer, S. Ringhoffer, M. Wiesneth, J. Greiner, D. Michel, T. Mertens, M. Rojewski, M. Marx, S. von Harsdorf, H. Döhner, E. Seifried, D. Bunjes, et M. Schmitt, « Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation », *Transfusion (Paris)*, vol. 51, n° 3, p. 591-599, mars 2011.
- [4] B. Feuerstein, T. G. Berger, C. Maczek, C. Röder, D. Schreiner, U. Hirsch, I. Haendle, W. Leisgang, A. Glaser, O. Kuss, T. L. Diepgen, G. Schuler, et B. Schuler-Thurner, « A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use », *J. Immunol. Methods*, vol. 245, n° 1-2, p. 15-29, nov. 2000.
- [5] T. Feuchtinger, K. Opherck, W. A. Bethge, M. S. Topp, F. R. Schuster, E. M. Weissinger, M. Mohty, R. Or, M. Maschan, M. Schumm, K. Hamprecht, R. Handgretinger, P. Lang, et H. Einsele, « Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation », *Blood*, vol. 116, n° 20, p. 4360-4367, nov. 2010.
- [6] S. Mackinnon, K. Thomson, S. Verfurth, K. Peggs, et M. Lowdell, « Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells », *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 40, n° 1, p. 63-67, févr. 2008.
- [7] J.-B. Lim, O. H. Kwon, H.-S. Kim, H. O. Kim, J. R. Choi, M. Provenzano, et D. Stroncek, « Adoptive immunotherapy for cytomegalovirus (CMV) disease in immunocompromised patients », *Yonsei Med. J.*, vol. 45 Suppl, p. 18-22, juin 2004.
- [8] C. R. Li, P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, J. M. Goodrich, et S. R. Riddell, « Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis », *Blood*, vol. 83, n° 7, p. 1971-1979, avr. 1994.
- [9] « Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/\(offset\)/3#paragraph_2269](http://ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/(offset)/3#paragraph_2269). [Consulté le: 11-nov-2014].
- [10] « Bonnes Pratiques relatives aux tissus, cellules et produits de thérapie cellulaire », disponible sur www.agence-biomedecine.fr [Consulté le 16-nov-2010].
- [11] « Etablissement Français du Sang ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.dondusang.net/rewrite/heading1/758/l-efs.htm?idRubrique=758> [consulté le 11 nov-2014].

- [12] J. Hoggatt et L. M. Pelus, « Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 2, n° 2, p. 13, 2011.
- [13] P. J. Hanley, S. Lam, E. J. Shpall, et C. M. Bollard, « Expanding cytotoxic T lymphocytes from umbilical cord blood that target cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and adenovirus », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 63, p. e3627, 2012.
- [14] R. Paquette et K. Dorshkind, « Optimizing hematopoietic recovery following bone marrow transplantation », *J. Clin. Invest.*, vol. 109, n° 12, p. 1527-1528, juin 2002.
- [15] D. T. Fogue, « Profil de l'hémogramme », 26-nov-2005.
- [16] C. Thibaudeau, G. Flandrois, E. Piteux, F. Auffray, S. Martin, P. Simon, B. Laviron, N. Duvieu, C. Morineau, A. G. Leaute, F. Dehaut, et S. Derenne, « [Optimization of a haematopoietic stem cell freezing process using a qualification protocol applicable to a programmable freezer] », *Transfus. Clin. Biol. J. Société Fr. Transfus. Sang.*, vol. 18, n° 5-6, p. 542-552, déc. 2011.
- [17] A. Gratwohl, H. Baldomero, M. Aljurf, M. C. Pasquini, L. F. Bouzas, A. Yoshimi, J. Szer, J. Lipton, A. Schwendener, M. Gratwohl, K. Frauendorfer, D. Niederwieser, M. Horowitz, et Y. Kodera, « Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective », *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 303, n° 16, p. 1617-1624, avr. 2010.
- [18] « Société Française d'Hémaphérèse - Bienvenue ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.hemapherese.fr/>. [Consulté le: 18-mai-2014].
- [19] « Le don de moelle osseuse ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.dondemoelleosseuse.fr/>. [Consulté le: 05-mai-2011].
- [20] A. Dahlberg, C. Delaney, et I. D. Bernstein, « Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells », *Blood*, mars 2011.
- [21] T. H. O. Nguyen, G. P. Westall, T. E. Bull, A. C. Meehan, N. A. Mifsud, et T. C. Kotsimbos, « Cross-reactive anti-viral T cells increase prior to an episode of viral reactivation post human lung transplantation », *PloS One*, vol. 8, n° 2, p. e56042, 2013.
- [22] H. Vié, « Intérêts du transfert adoptif de lymphocytes T après les greffes », *Hématologie*, vol. 4, n° 2, p. 125, mars 1998.
- [23] P. Reusser, S. R. Riddell, J. D. Meyers, et P. D. Greenberg, « Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease », *Blood*, vol. 78, n° 5, p. 1373-1380, sept. 1991.
- [24] S. R. Lewin, G. Heller, L. Zhang, E. Rodrigues, E. Skulsky, M. R. M. van den Brink, T. N. Small, N. A. Kernan, R. J. O'Reilly, D. D. Ho, et J. W. Young, « Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations », *Blood*, vol. 100, n° 6, p. 2235-2242, sept. 2002.
- [25] « Lymphocyte T cytotoxique - Wikipédia ». [En ligne]. Disponible sur: http://fr.wikipedia.org/wiki/Lymphocyte_T_cytotoxique [Consulté le 11-nov-2014].
- [26] K. R. Demers, M. A. Reuter, et M. R. Betts, « CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis », *Immunol. Rev.*, vol. 254, n° 1, p. 190-206, juill. 2013.
- [27] L. Lefrançois et J. J. Obar, « Once a killer, always a killer: from cytotoxic T cell to memory cell », *Immunol. Rev.*, vol. 235, n° 1, p. 206-218, mai 2010.
- [28] « blobs.org - Acquired Immunity ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.blobs.org/science/article.php?article=12>. [Consulté le: 12-août-2014].
- [29] F. Dazzi et J. M. Goldman, « Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation », *Annu. Rev. Med.*, vol. 49, p. 329-340, 1998.

- [30] M. Introna, A. M. Barbui, J. Golay, et A. Rambaldi, « Innovative cell-based therapies in onco-hematology: what are the clinical facts ? », *Haematologica*, vol. 89, n° 10, p. 1253-1260, oct. 2004.
- [31] T. Feuchtinger, K. Opherck, O. Bicanic, M. Schumm, G. U. Grigoleit, K. Hamprecht, G. Jahn, R. Handgretinger, et P. Lang, « Dendritic cell vaccination in an allogeneic stem cell recipient receiving a transplant from a human cytomegalovirus (HCMV)-seronegative donor: induction of a HCMV-specific T(helper) cell response », *Cytotherapy*, vol. 12, n° 7, p. 945-950, nov. 2010.
- [32] S. R. Riddell, M. Rabin, A. P. Geballe, W. J. Britt, et P. D. Greenberg, « Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 146, n° 8, p. 2795-2804, avr. 1991.
- [33] Lamia Aïssi-Rothé, Véronique Decot, Ying Ying Wang, Jean-François Stoltz, Danièle Bensoussan, « Apport des méthodes d'isolement immunomagnétique de lymphocytes T cytotoxiques dans la restauration rapide d'une immunité antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques », *Rev. Francoph. Lab. Vol. 2012 Issue 439 Part 1 Febr. 2012 Pages 55-60*.
- [34] L. E. Clancy, E. Blyth, R. M. Simms, K. P. Micklethwaite, C.-K. K. Ma, J. S. Burgess, V. Antonenas, P. J. Shaw, et D. J. Gottlieb, « Cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can be efficiently expanded from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized hemopoietic progenitor cell products ex vivo and safely transferred to stem cell transplantation recipients to facilitate immune reconstitution », *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, vol. 19, n° 5, p. 725-734, mai 2013.
- [35] R. J. O'Reilly, J. F. Lacerda, K. G. Lucas, N. S. Rosenfield, T. N. Small, et E. B. Papadopoulos, « Adoptive cell therapy with donor lymphocytes for EBV-associated lymphomas developing after allogeneic marrow transplants », *Important Adv. Oncol.*, p. 149-166, 1996.
- [36] K. Taniguchi, S. Yoshihara, H. Tamaki, T. Fujimoto, K. Ikegame, K. Kaida, J. Nakata, T. Inoue, R. Kato, T. Fujioka, M. Okada, T. Soma, et H. Ogawa, « Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation », *Ann. Hematol.*, vol. 91, n° 8, p. 1305-1312, août 2012.
- [37] K. Yago, M. Itoh, et H. Shimada, « [Successful donor lymphocyte infusion for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder after allogeneic bone marrow transplantation from an HLA 1-locus-mismatched sibling donor in a patient with acute lymphocytic leukemia] », *Rinshō Ketsueki Jpn. J. Clin. Hematol.*, vol. 42, n° 11, p. 1105-1110, nov. 2001.
- [38] L. Xuan, F. Huang, Z. Fan, H. Zhou, X. Zhang, G. Yu, Y. Zhang, C. Liu, J. Sun, et Q. Liu, « Effects of intensified conditioning on Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 5, p. 46, 2012.
- [39] C. C. Dvorak, A. L. Gilman, B. Horn, J. Jaroscak, E. A. Dunn, L. A. Baxter-Lowe, et M. J. Cowan, « Clinical and immunologic outcomes following haplocompatible donor lymphocyte infusions », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 44, n° 12, p. 805-812, déc. 2009.
- [40] A. M. Leen, T. Tripic, et C. M. Rooney, « Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, n° 3, p. 337-351, mars 2010.
- [41] I. André-Schmutz, F. Le Deist, S. Hacein-Bey, Y. Hamel, E. Vitetta, J. Schindler, A. Fischer, et M. Cavazzana-Calvo, « Donor T lymphocyte infusion following ex vivo

- depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin », *Transplant. Proc.*, vol. 34, n° 7, p. 2927-2928, nov. 2002.
- [42] D. Montagna, E. Yvon, V. Calcaterra, P. Comoli, F. Locatelli, R. Maccario, A. Fisher, et M. Cavazzana-Calvo, « Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity », *Blood*, vol. 93, n° 10, p. 3550-3557, mai 1999.
- [43] H. Einsele, E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Löffler, U. Grigoleit, A. Moris, H.-G. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn, et H. Hebart, « Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy », *Blood*, vol. 99, n° 11, p. 3916-3922, juin 2002.
- [44] U. Gerdemann, J. F. Vera, C. M. Rooney, et A. M. Leen, « Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 51, 2011.
- [45] F. Ghiringhelli et E. Schmitt, « [Cellular and molecular purification processes based on the use of magnetic micro-and nanobeads] », *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 62, n° 1, p. 73-78, févr. 2004.
- [46] Y. Fujita, A. M. Leen, J. Sun, Y. Nakazawa, E. Yvon, H. E. Heslop, M. K. Brenner, et C. M. Rooney, « Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy », *J. Immunother. Hagerstown Md 1997*, vol. 31, n° 7, p. 665-674, sept. 2008.
- [47] « MiltenyiBiotec_DataSheet_Large-Scale-IFN- γ -Secretion-Assay—Enrichment-Kit,-human_130-091-329.pdf », disponible sur www.miltenyibiotec.com, [Consulté le 15-mars-2014] .
- [48] « Stage Cell Therapeutics-Technologies ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.stage-celltherapeutics.com/auswahl/technologies.php>. [Consulté le: 20-août-2014].
- [49] M. Cobbold, N. Khan, B. Pourgheysari, S. Tauro, D. McDonald, H. Osman, M. Assenmacher, L. Billingham, C. Steward, C. Crawley, E. Olavarria, J. Goldman, R. Chakraverty, P. Mahendra, C. Craddock, et P. A. H. Moss, « Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers », *J. Exp. Med.*, vol. 202, n° 3, p. 379-386, août 2005.
- [50] M. L. Zandvliet, E. van Liempt, I. Jedema, S. Kruithof, M. G. D. Kester, H.-J. Guchelaar, J. H. F. Falkenburg, et P. Meij, « Simultaneous isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation », *J. Immunother. Hagerstown Md 1997*, vol. 34, n° 3, p. 307-319, avr. 2011.
- [51] N. Khanna, C. Stuehler, B. Conrad, S. Lurati, S. Krappmann, H. Einsele, C. Berges, et M. S. Topp, « Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154 », *Blood*, vol. 118, n° 4, p. 1121-1131, juill. 2011.
- [52] E. R. Samuel, K. Newton, S. Mackinnon, et M. W. Lowdell, « Successful isolation and expansion of CMV-reactive T cells from G-CSF mobilized donors that retain a strong cytotoxic effector function », *Br. J. Haematol.*, vol. 160, n° 1, p. 87-100, janv. 2013.
- [53] B. Hammoud, M. Schmuck, A. M. Fischer, H. Fuehrer, S.-J. Park, L. Akyuez, J. C. Schefold, M. J. Raftery, G. Schönrich, A. M. Kaufmann, H.-D. Volk, et P. Reinke, « HCMV-specific T-cell therapy: do not forget supply of help », *J. Immunother. Hagerstown Md 1997*, vol. 36, n° 2, p. 93-101, févr. 2013.

- [54] K. S. Peggs, K. Thomson, E. Samuel, G. Dyer, J. Armoogum, R. Chakraverty, K. Pang, S. Mackinnon, et M. W. Lowdell, « Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation », *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 52, n° 1, p. 49-57, janv. 2011.
- [55] G. Rauser, H. Einsele, C. Sinzger, D. Wernet, G. Kuntz, M. Assenmacher, J. D. M. Campbell, et M. S. Topp, « Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants », *Blood*, vol. 103, n° 9, p. 3565-3572, mai 2004.
- [56] N. Babel, G. Brestrich, L. P. Gondek, A. Sattler, M. W. Wlodarski, N. Poliak, N. Bethke, A. Thiel, M. H. Hammer, P. Reinke, et J. P. Maciejewski, « Clonotype analysis of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 20, n° 2, p. 344-352, févr. 2009.
- [57] T. Feuchtinger, P. Lang, K. Hamprecht, M. Schumm, J. Greil, G. Jahn, D. Niethammer, et H. Einsele, « Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy », *Exp. Hematol.*, vol. 32, n° 3, p. 282-289, mars 2004.
- [58] « CytomégaloVirus - Wikipédia ». [En ligne]. Disponible sur: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cytom%C3%A9galovirus> [consulté le: 25-mai-2014].
- [59] S. Alain, « cnr-cytomegalovirus.fr ». [En ligne]. Disponible sur: <http://cnr-cytomegalovirus.fr/>. [Consulté le: 25-mai-2014].
- [60] 2007 S. Alain, « Le cytomegalovirus humain », www.unilim.fr, 18-mai-2014. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.unilim.fr/cnr-cytomegalovirus-test/spip.php?article21> [Consulté le: 25-mai-2014].
- [61] S. Hantz, « Résistance du cytomégaloVirus aux antiviraux : de la clinique à la structure ». 23-oct-2009.
- [62] C. N. Kotton, « CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 13 Suppl 3, p. 24-40; quiz 40, févr. 2013.
- [63] E. Meijer, G. J. Boland, et L. F. Verdonck, « Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, n° 4, p. 647-657, oct. 2003.
- [64] M. Huerta, R. D. Balicer, et A. Leventhal, « SWOT analysis: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the Israeli Smallpox Revaccination Program », *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ*, vol. 5, n° 1, p. 42-46, janv. 2003.
- [65] N. Ibargoyen-Roteta, I. Gutiérrez-Ibarluzea, R. Rico-Iturriz, M. López-Argumedo, E. Reviriego-Rodrigo, J. L. Cabriada-Nuño, et H. J. Schünemann, « The GRADE approach for assessing new technologies as applied to apheresis devices in ulcerative colitis », *Implement. Sci. IS*, vol. 5, p. 48, 2010.
- [66] T. Van Durme, J. Macq, S. Anthierens, L. Symons, O. Schmitz, D. Paulus, K. Van den Heede, et R. Remmen, « Stakeholders' perception on the organization of chronic care: a SWOT analysis to draft avenues for health care reforms », *BMC Health Serv. Res.*, vol. 14, n° 1, p. 179, avr. 2014.
- [67] U. Gerdemann, U. L. Katari, A. Papadopoulou, J. M. Keirnan, J. A. Craddock, H. Liu, C. A. Martinez, A. Kennedy-Nasser, K. S. Leung, S. M. Gottschalk, R. A. Krance, M. K. Brenner, C. M. Rooney, H. E. Heslop, et A. M. Leen, « Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant », *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 21, n° 11, p. 2113-2121, nov. 2013.

- [68] L. Bao, M. J. Cowan, K. Dunham, B. Horn, J. McGuirk, A. Gilman, et K. G. Lucas, « Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections », *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997, vol. 35, n° 3, p. 293-298, avr. 2012.
- [69] U. Sili, A. M. Leen, J. F. Vera, A. P. Gee, H. Huls, H. E. Heslop, C. M. Bollard, et C. M. Rooney, « Production of good manufacturing practice-grade cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and adenovirus to prevent or treat viral infections post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant », *Cytotherapy*, vol. 14, n° 1, p. 7-11, janv. 2012.
- [70] A. M. Leen, C. M. Bollard, A. M. Mendizabal, E. J. Shpall, P. Szabolcs, J. H. Antin, N. Kapoor, S.-Y. Pai, S. D. Rowley, P. Kebriaei, B. R. Dey, B. J. Grilley, A. P. Gee, M. K. Brenner, C. M. Rooney, et H. E. Heslop, « Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation », *Blood*, vol. 121, n° 26, p. 5113-5123, juin 2013.
- [71] « Immunotherapy for clinical research - Clinical applications - Miltenyi Biotec ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.miltenyibiotec.com/en/clinical-applications/immunotherapy.aspx>. [Consulté le: 24-août-2014].
- [72] L. Dong, Z.-Y. Gao, L.-J. Chang, Y. Liang, X.-Y. Tan, J.-H. Liu, X.-J. Yu, F.-H. Yang, Y. Xie, et D.-P. Lu, « Adoptive transfer of cytomegalovirus/Epstein-Barr virus-specific immune effector cells for therapeutic and preventive/preemptive treatment of pediatric allogeneic cell transplant recipients », *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 32, n° 1, p. e31-37, janv. 2010.
- [73] « The Cost of Prevention and Treatment of CMV Retinitis - TheBody.com ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.thebody.com/content/art42959.html>. [Consulté le: 24-août-2014].
- [74] L. Bao, K. Dunham, M. Stamer, K. M. Mulieri, et K. G. Lucas, « Expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1 specific cytotoxic T lymphocytes for cytomegalovirus-specific immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation », *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, vol. 14, n° 10, p. 1156-1162, oct. 2008.
- [75] E. Blyth, L. Clancy, R. Simms, C. K. K. Ma, J. Burgess, S. Deo, K. Byth, M.-C. Dubosq, P. J. Shaw, K. P. Micklethwaite, et D. J. Gottlieb, « Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation », *Blood*, vol. 121, n° 18, p. 3745-3758, mai 2013.
- [76] L. Aïssi-Rothé, V. Decot, V. Venard, H. Jeulin, A. Salmon, L. Clement, A. Kennel, C. Mathieu, J. H. Dalle, G. Rauser, C. Cambouris, M. de Carvalho, J. F. Stoltz, P. Bordigoni, et D. Bensoussan, « Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy », *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997, vol. 33, n° 4, p. 414-424, mai 2010.
- [77] G. M. Wilkie, C. Taylor, M. M. Jones, D. M. Burns, M. Turner, D. Kilpatrick, P. L. Amlot, D. H. Crawford, et T. Haque, « Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of epstein-barr virus-associated diseases », *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997, vol. 27, n° 4, p. 309-316, août 2004.
- [78] « Le contexte réglementaire des médicaments de thérapie innovante - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ». [En ligne]. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Le-contexte-reglementaire-des-medicaments-de-therapie-innovante/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et-preparations-cellulaires-a-finalite-therapeutique/Le-contexte-reglementaire-des-medicaments-de-therapie-innovante/(offset)/0). [Consulté le: 11-oct-2014].

- [79] M. Hildebrandt et S. Sethe, « Caught in the gap: ATMP manufacture in academia ». International Society for Cellular Therapy, janv-2012.
- [80] M. N. Prichard et E. R. Kern, « The search for new therapies for human cytomegalovirus infections », *Virus Res.*, vol. 157, n° 2, p. 212-221, mai 2011.
- [81] A. M. Arvin, P. Fast, M. Myers, S. Plotkin, R. Rabinovich, et National Vaccine Advisory Committee, « Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee », *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 39, n° 2, p. 233-239, juill. 2004.
- [82] E. C. Swanson et M. R. Schleiss, « Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy », *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 60, n° 2, p. 335-349, avr. 2013.
- [83] C. La Rosa, J. Longmate, S. F. Lacey, T. Kaltcheva, R. Sharan, D. Marsano, P. Kwon, J. Drake, B. Williams, S. Denison, S. Broyer, L. Couture, R. Nakamura, S. Dadwal, M. I. Kelsey, A. M. Krieg, D. J. Diamond, et J. A. Zaia, « Clinical evaluation of safety and immunogenicity of PADRE-cytomegalovirus (CMV) and tetanus-CMV fusion peptide vaccines with or without PF03512676 adjuvant », *J. Infect. Dis.*, vol. 205, n° 8, p. 1294-1304, avr. 2012.
- [84] M. R. Schleiss, « VCL-CB01, an injectable bivalent plasmid DNA vaccine for potential protection against CMV disease and infection », *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 11, n° 5, p. 572-578, oct. 2009.
- [85] X. Luo, Y. Chang, M. Huo, D. Li, et X. Huang, « [Cytomegalovirus-specific T cells immune reconstitution after human leukocyte antigen matched sibling donor allogeneic bone marrow plus peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation] », *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi*, vol. 33, n° 8, p. 605-609, août 2012.
- [86] X. Gong, H. Chen, T. Chen, et H. Qu, « Unit operation optimization for the manufacturing of botanical injections using a design space approach: a case study of water precipitation », *PloS One*, vol. 9, n° 8, p. e104493, 2014.
- [87] « ALCAL : un produit au coeur du concept ISOS ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.isos.fr/fr/alcal.htm>. [Consulté le: 19-août-2014].
- [88] J. J. Melenhorst, A. M. Leen, C. M. Bollard, M. F. Quigley, D. A. Price, C. M. Rooney, M. K. Brenner, A. J. Barrett, et H. E. Heslop, « Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects », *Blood*, vol. 116, n° 22, p. 4700-4702, nov. 2010.
- [89] A. Moosmann, I. Bigalke, J. Tischler, L. Schirrmann, J. Kasten, S. Tippmer, M. Leeping, D. Prevalsek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D. J. Schendel, et H.-J. Kolb, « Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells », *Blood*, vol. 115, n° 14, p. 2960-2970, avr. 2010.
- [90] M. L. Zandvliet, J. H. F. Falkenburg, E. van Liempt, L. A. Veltrop-Duits, A. C. Lankester, J. S. Kalpoe, M. G. D. Kester, D. M. van der Steen, M. J. van Tol, R. Willemze, H.-J. Guchelaar, M. W. Schilham, et P. Meij, « Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection », *Haematologica*, vol. 95, n° 11, p. 1943-1951, nov. 2010.
- [91] L. Tramsen, U. Koehl, T. Tonn, J.-P. Latgé, F. R. Schuster, A. Borkhardt, L. Uharek, R. Quaritsch, O. Beck, E. Seifried, T. Klingebiel, et T. Lehrnbecher, « Clinical-scale generation of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunotherapy », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 43, n° 1, p. 13-19, janv. 2009.
- [92] M. Odendahl, G. U. Grigoleit, H. Bönig, M. Neuenhahn, J. Albrecht, F. Anderl, L. Germeroth, M. Schmitz, M. Bornhäuser, H. Einsele, E. Seifried, D. H. Busch, et T. Tonn,

« Clinical-scale isolation of “minimally manipulated” cytomegalovirus-specific donor lymphocytes for the treatment of refractory cytomegalovirus disease », *Cytotherapy*, vol. 16, n° 9, p. 1245-1256, sept. 2014.

- [93] T. Feuchtinger, S. Matthes-Martin, C. Richard, T. Lion, M. Fuhrer, K. Hamprecht, R. Handgretinger, C. Peters, F. R. Schuster, R. Beck, M. Schumm, R. Lotfi, G. Jahn, et P. Lang, « Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation », *Br. J. Haematol.*, vol. 134, n° 1, p. 64-76, juill. 2006.

Vu, le Président du jury,

Monsieur Jean-Marie Bard

Vu, le Directeur de thèse,

Monsieur Frédéric DEHAUT

Vu, le Directeur de l'UFR,

Madame Virginie Ferré

Nom – Prénom : **BRELET Fabien**

Titre de la thèse : **Immunothérapie adoptive après allogreffe de cellules souches:
Intérêt et production de Lymphocytes T cytotoxiques anti-CMV**

Résumé de la thèse :

Le Cytomégalovirus (CMV) est un virus responsable de mortalité importante lors de l'immunodépression des patients greffés en cellules souches hématopoïétiques.

Une des voies possibles de traitement de ces infections opportunistes consiste en l'injection au patient de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre ce virus.

L'objectif de cette thèse est de présenter l'intérêt de ce traitement et un processus de production de CTL anti-CMV répondant aux principes des « Bonnes Pratiques de Fabrication » de l'industrie pharmaceutique, et transposable à l'Unité d'Ingénierie Cellulaire de Nantes.

Mots clés : THERAPIE CELLULAIRE, CYTOMEGALOVIRUS, GREFFE,
LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES, CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

TITRE en anglais : Adoptive immunotherapy post stemcells transplant: Interest and production of Cytotoxic T Lymphocytes anti-CMV

Résumé en anglais:

Cytomegalovirus is a virus responsible for significant mortality in the immunocompromised transplant patients in hematopoietic stem cells. One possible way of treating those opportunistic infections involves injecting the patient CTL directed against this virus. The objective of this thesis is to show the interest of this treatment and to provide a process for the production of anti-CMV CTL with the standards of "Good Manufacturing Practices" of the pharmaceutical industry, and transposed to the Cell Engineering Unit (Nantes).

JURY :

PRÉSIDENT :

Mr Jean-Marie Bard,
Professeur de Biochimie -
Praticien Hospitalier,
UFR des Sciences
Pharmaceutiques et
Biologiques

ASSESSEURS :

Mr Frédéric DEHAUT,
Professeur associé, directeur
EFS centre Atlantique

Mme Sophie Derenne,
PRI – Directeur EFS Atlantic
Bio GMP

Adresse de l'auteur : 44 Route des Meuniers, 44450 St Julien de Concelles
Adresse e-mail : f.brelet@gmail.com