

SCANCELL

Analyse de faisabilité de la commercialisation d'un ensemble de tests destinés à la
détection *in vitro* des cellules tumorales en thérapie cellulaire

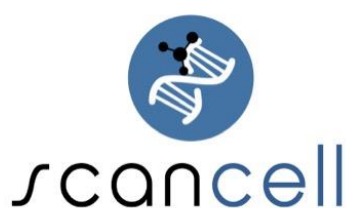
Mémoire réalisé en vue de l'obtention du grade de
Master 120 à finalité spécialisée en

Biochimie et biologie moléculaire et cellulaire – BBMC2MS/BT
Charlotte Bertrand

Droit - DROI2M
Antoine Logé

Ingénieur de gestion – INGE2M
Robin Pétré

Promoteurs
Prof. Frank Janssen (LSM)
Prof. René Rezsohazy (SC)
Prof. Alain Strowel (DRT)



Année académique 2015-2016

Executive summary

La thérapie cellulaire se confirme depuis plusieurs années comme un nouvel espoir de guérison de maladies qui, jusque-là, paraissaient incurables.

Le principe de cette thérapie est très simple : prélever des cellules chez un patient, pour les spécialiser afin de les réinjecter sous formes de « cellules-médicaments ». Une méthode nettement moins invasive que la majorité des traitements actuels et pour laquelle les recherches récentes laissent entrevoir de vastes possibilités.

Un bémol de taille se dresse pourtant entre le patient et sa guérison : en effet, lors de la spécialisation des cellules, c'est-à-dire la création de « cellules-médicaments » peuvent apparaître des cellules tumorales pouvant entraîner des complications chez le patient.

Scancell intervient dans ce processus, en proposant aux entreprises de thérapie cellulaire une combinaison de trois tests économiquement et scientifiquement plus attractive que les procédés actuellement utilisés. Ces tests ont été développés en collaboration avec l'entreprise belge de renommée mondiale *Celyad* située dans une région à forte densité biotechnologique.

L'équipe de ce projet est composée de compétences complémentaires : elle rassemble une biologiste, Charlotte Bertrand, un juriste, Antoine Logé, et un économiste, Robin Pétré, provenant tous trois de la formation interdisciplinaire en création d'entreprise (CPME) de l'Université catholique de Louvain.

Ensemble, ils ont pour ambition d'apporter à ce marché une solution convaincante via l'implantation d'une stratégie en trois phases, qui s'initiera lors de la création de l'entreprise en octobre 2016 et de l'implantation physique de ses laboratoires.

Une première étape de recherche, pendant six mois, permettra de valider le développement des tests, pour permettre dans un second temps de proposer leur produit sous forme de service à nos clients. Après un an, les tests prendront leur configuration finale, prêts à être vendus sous forme de kits partout en Europe. Pour parvenir à ce point, l'apport des fondateurs combiné avec un emprunt bancaire suffira pour financer les six premiers mois d'exercice. Ensuite, un *Business Angel* s'intégrera au projet, apportant les 100 000 € nécessaires pour mener à bien la deuxième phase, à l'issue de laquelle une dernière contribution de 100 000 € permettra d'assurer la pérennité de l'entreprise, en atteignant le seuil de rentabilité, un peu plus d'un an et demi après la création de *Scancell*.

Mots-clés : thérapie cellulaire, tumorigénicité, détection *in vitro*, biotechnologie, *release*

Remerciements

A l'issue de notre processus de réflexion et de recherche, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette aventure tant académique qu'entrepreneuriale.

Nos remerciements vont tout d'abord à nos promoteurs, le professeur Frank Janssen, le professeur René Rezsohazy et le professeur Alain Strowel, pour leur encadrement et leurs conseils avisés tout au long de ces deux années. Plus généralement, nous remercions la formation CPME pour l'opportunité de développer un projet inter-facultaire et les enseignements qu'il nous a permis de tirer.

Ensuite, nous tenons tout particulièrement à remercier monsieur Didier Cloquet, qui nous a encadrés en nous faisant profiter de sa longue expérience du secteur, et nous a permis de crédibiliser une part importante de nos hypothèses, mais aussi monsieur Pierre Le Rigoleur, CPME-alumni, qui nous a mis au défi de jongler entre les différentes dimensions du projet.

L'équipe remercie également *Celyad*, qui nous a fait bénéficier d'une problématique réelle et a fait confiance à Charlotte Bertrand pour le développement d'une technologie qui y réponde.

Nous souhaitons aussi remercier les professionnels du secteur, qui, de près ou de loin, ont participé à la réussite de ce projet : en particulier, mesdames et messieurs Philippe Van Der Hosftadt de *B&C Group*, Jean-François Decoster de *UCB*, Sylvie Ponchaut de *Biowin* et Nadège Grabowski de *Bone Therapeutics*.

Finalement, cette liste ne serait pas complète sans les remerciements à nos familles, pour leur encouragement et leur soutien lors de la réalisation de ce projet.

Table des matières

I	Analyse de faisabilité de la commercialisation d'un ensemble de tests destinés à la détection <i>in vitro</i> des cellules tumorales en thérapie cellulaire	9
	Introduction	19
1	Mise en contexte	21
1.1	Genèse du projet	22
1.2	Equipe	25
2	Opportunité	29
2.1	Demande	30
2.2	Marché de la thérapie cellulaire	40
2.3	Offre	44
2.4	Macro-environnement	60
2.5	Micro-environnement	70
3	Stratégie	79
3.1	Mission et vision	80
3.2	Déploiement stratégique en trois phases	81
3.3	Capacité stratégique	89
3.4	Diagnostic stratégique	96
3.5	Choix stratégiques	100
3.6	Evolution commerciale	106
3.7	Analyse SWOT	112
4	Analyse opérationnelle	121
4.1	Logistique	123
4.2	Infrastructures	135
4.3	Recherche et développement	140
4.4	Protection de l'innovation.	144
4.5	Autres protections juridiques.	160

4.6	Gestion des relations commerciales	167
4.7	Gestion administrative	177
5	Analyse financière	183
5.1	Evolution des revenus	184
5.2	Dépenses	186
5.3	Financement	190
5.4	Résultats et indicateurs de performance	195
5.5	Valorisation	198
5.6	Analyse de sensibilité	202
5.7	Analyse de risque	205
	Conclusion	207
 II Annexes		213
A	Annexes scientifiques	215
B	Etude de marché	365
B.1	Résultats de l'étude de marché	366
B.2	Interviews	369
B.3	Liste des entreprises belges de thérapie cellulaire.	390
B.4	Liste des établissements belges autorisés pour l'utilisation de MCH.	391
B.5	Liste des laboratoires de recherche de thérapie cellulaire	394
B.6	Liste des concurrents et entrants potentiels.	395
C	Curriculum vitae	397
C.1	Charlotte Bertrand	398
C.2	Antoiné Logé	399
C.3	Robin Pétré	400
D	Annexes juridiques	401
E	Annexes financières	413
E.1	Détail du coût des tests	414
E.2	Bilan prévisionnel à trois ans.	417
E.3	Résultats prévisionnels à trois ans.	418
E.4	Flux de trésorerie	419
E.5	Devis.	420
 III Bibliographie		425

PREMIÈRE PARTIE

Analyse de faisabilité de la commercialisation d'un ensemble de tests destinés à la détection *in vitro* des cellules tumorales en thérapie cellulaire

Table des figures

2.1	Processus de développement d'une thérapie cellulaire, de la recherche fondamentale en laboratoire à la commercialisation par les entreprises.	37
2.2	Evolution du marché de la thérapie cellulaire belge. La figure présente l'évolution du nombre de patients traités par les entreprises de thérapie cellulaire d'ici 2020, à l'échelle européenne (Rapports d'actionnaire ; EMA 2015).	42
2.3	Configurations d'un télomère de longueur normale et d'un télomère de longueur minimale critique, obtenue suite à son raccourcissement au fur et à mesure des divisions de la cellule (adapté de (Galati et al. 2013)).	45
2.4	Mécanismes d'allongement des télomères utilisés par les cellules tumorales. (a) Mécanisme basé sur l'activité de la télomérase hTERT (Park 2010), et (b) mécanisme ALT, modèle basé sur la recombinaison homologue entre deux télomères (Verdun & Karlseder 2007).	46
2.5	Principe de la RT-qPCR TaqMan en une réaction (adapté à partir de (Biorad n.d.)).	50
2.6	Principe de l'ASB-qPCR (adapté à partir de (Morlan et al. 2009)).	53
2.7	Principe de la qPCR <i>multiplex</i> monochrome utilisant le SYBR Green I (Sigma-Aldrich n.d.).	54
2.8	Fiabilité statistique de Telocell.	58
2.9	Croissance annuelle moyenne de la production industrielle du secteur pharmaceutique. Comparaison entre l'Union Européenne et la Belgique entre 2005 et 2014 (Essencia 2014).	60
2.10	Analyse PESTEL du macro-environnement.	61
2.11	Hexagone sectoriel illustrant l'attractivité du secteur des tests de <i>release</i> pour la thérapie cellulaire. Représente la pondération estimée des 5(+1) forces de Porter.	76
3.1	Lien entre la chaîne de valeur de <i>Scancell</i> et celle de ses clients, les acteurs de la thérapie cellulaire.	96
3.2	Chaîne de valeur selon Porter de <i>Scancell</i>.	98

3.3	Horloge de Bowman montrant le positionnement concurrentiel de <i>Scancell</i>.	102
3.4	Cartographie concurrentielle montrant le positionnement éponyme de <i>Scancell</i>, en termes de fiabilité et d'attractivité commerciale (durée et prix) en comparaison avec les méthodes alternatives.	104
3.5	Processus de développement d'un médicament anti-cancéreux (Willmann et al. 2008).	110
3.6	Position des produits anti-cancéreux dirigés contre la prostate, par catégorie, sur la chaîne de développement. La situation thérapeutique du cancer de la prostate est représentative de la situation globale en ce qui concerne les thérapies anti-cancéreuses actuelles (Trewartha & Carter 2013).	111
3.7	Matrice d'analyse stratégique SWOT de <i>Scancell</i>.	112
4.1	Organisation de la production et filières industrielles.	124
4.2	<i>Flow chart</i> représentant la succession des étapes de la production des trois tests de telocell. Les étapes générales sont ici représentées, et sont identiques pour les deux tests d'analyse de htert (ce qui explique la présence de deux branches plutôt que trois). A chaque étape sont attribuées différentes spécifications pour chaque test.	127
4.3	<i>Flow chart</i> représentant les étapes nécessaires à la création et au maintien d'une banque cellulaire (Sigma-Aldrich n.d.).	130
4.4	Organisation des laboratoires au cours des différentes phases stratégiques	135
5.1	Nombre de produits vendus par mois, par catégorie, entre la création de l'entreprise et décembre 2019.	185
5.2	Evolution du chiffre d'affaire mensuel entre la création de l'entreprise et octobre 2020.	186
5.3	Evolution de la trésorerie sans financement, pour déterminer le besoin en financement de l'entreprise.	190
5.4	Seuil de rentabilité de <i>Scancell</i>, suivant l'évolution des charges et chiffre d'affaires.	195
5.5	Bénéfice (ou EBITDA en anglais), la différence entre le chiffre d'affaires et les charges fixes et variables de <i>Scancell</i>, entre Octobre 2016 et Août 2019.	196
5.6	Evolution de la trésorerie mois par mois avec le financement pré-cité.	197
5.7	Evolution du bénéfice mensuel de <i>Scancell</i> en fonction d'une modification du prix du produit.	202
5.8	Evolution du bénéfice mensuel de <i>Scancell</i> en fonction d'une modification des royalties versés à <i>Celyad</i>.	203

5.9	Evolution du bénéfice mensuel de <i>Scancell</i> en fonction d'une modification de trois mois de la date de commercialisation des kits.	204

Liste des tableaux

2.1	Tableau comparatif des méthodes existantes pour l'évaluation de la tumorigénicité <i>in vitro</i>.	35
2.2	Produits belges de la thérapie cellulaire. Le tableau présente les différents produits dont le contrôle qualité est réalisé en Belgique qui seront commercialisés d'ici 2020. Le nombre de patients traités par an a été calculé par l'estimation de la part de marché de ces entreprises (Rapports d'actionnaire).	41
2.3	Paramètres analysés dans le cadre d'un développement et d'une validation d'une méthode analytique limite et d'une méthode analytique quantitative (ICH Guidelines 2005).	48
2.4	Résultats de la validation du test limite « Mesure de l'expression du gène <i>hTERT</i> ». ND : non détecté	50
2.5	Gènes et mutations sélectionnés pour le test « Détection des mutations ALT » (IARC TP53 Databas ; Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013 ; Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Maze et al. 2012 ; Kondo et al. 2014). ND : non déterminé	52
2.6	Gènes et mutations sélectionnés pour le test « Détection des mutations ALT » (IARC TP53 Databas ; Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013 ; Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Maze et al. 2012 ; Kondo et al. 2014). ND : non détecté	53
2.7	Résultats de l'analyse de spécificité du test « Mesure de la longueur des télomères » en <i>singleplex</i>, après optimisation. ND : non détecté . .	55
2.8	Etat actuel des avancées en matière de développement et de validation de Telocell. Les paramètres analysés sont représentés par un +, les paramètres encore à analyser sont représentés par un -.	56
2.9	Intensité de la menace concurrentielle. Echelle de 1 (étant le moins dangereux) à 5 (étant le plus dangereux).	72
2.10	Principaux entrants potentiels sur le marché de <i>Scancell</i>. Le tableau présente un résumé des informations-clefs des principaux entrants potentiels du projet en thérapie cellulaire, sur base des informations disponibles en ligne et de leurs comptes annuels.	74

3.1	Déroulement de la stratégie en trois phases de <i>Scancell</i>.	85
3.2	Ressources et compétences définissant la capacité stratégique du projet <i>Scancell</i>.	92
4.1	Lignées tumorales choisies en fonction des thérapies cellulaires belges. BMMSC : <i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells</i> ; AMSC : <i>Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells</i> ; HALPC : <i>Human Adult Liver Progenitor Cells</i> ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; NK : <i>Natural Killers</i> ; ND : non déterminé.	132
4.2	Développements à réaliser pendant les six premiers mois d'exercice en phase 0.	141
4.3	Respect des critères de brevetabilité du kit mis au point par l'entreprise <i>Scancell</i>.	158
5.1	Ratio de rentabilité financière (ROE), sur quatre an d'exercices.	196
5.2	Analyse de sensibilité de la valorisation du projet <i>Scancell</i> à l'issue de l'an 3 en fonction de la valeur du bêta et du taux de croissance.	200
B.1	Liste des entreprises développant ou effectuant la QA de leurs produits en Belgique, et portefeuille de produits principaux avec phase d'essai clinique la plus avancée (Site internet des entreprises). N/A : non applicable.	390
B.2	Liste des établissements belges de matériel corporel humain agréés (AFMPS 2015) :	391
B.3	Liste des laboratoires de recherche de thérapie cellulaire (AFMPS 2015).	394
B.4	Menace concurrentielle : technologie principalement développée (information publique des entreprises	395

Abréviations¹

3F	<i>Friends, Family and Fools</i>
ADPIC	Aspects des droits de la propriété intellectuelle qui touchent au commerce
AFMPS	Agence fédérale des médicaments et des produits de santé
AIPPI	Association internationale pour la protection de la propriété intellectuelle
ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AR	Arrêté royal
art.	Article
ATMP	<i>Advanced Therapy Medicinal Product</i>
BAQ	Bureau Assurance Qualité
BMMSC	<i>Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells</i>
C. civ.	Code civil
C. pén.	Code pénal
C. soc.	Code des sociétés
C. trav.	Cour du travail
CA	Cour d'arbitrage
CASS	Cour de cassation
CBE	Convention sur le Brevet Européen
CDE	Code de Droit Economique
CDMO	<i>Contract Development and Manufacturing Organization</i>
CE	Commission Européenne
CEDH	Cour européenne des Droits de l'Homme
CEO	<i>Chief Executive Officer</i>
CFO	<i>Chief Financial Officer</i>
Civ. Anvers	Tribunal de première instance, chambre civile d'Anvers
CLO	<i>Chief Legal Officer</i>
CMO	<i>Contract Manufacturing Organization</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
CPME	Création de petites et moyennes entreprises

1. Pour ne pas perturber les automatismes visuels du lecteur francophone, nous avons suivi les conventions orthotypographiques françaises qui suggèrent de garder les acronymes invariables, contrairement à l'usage fait en langue anglaise.

CRO	<i>Contract Research Organization</i>
CRT	Chambre des recours techniques de l'office européen des brevets
CTOO	<i>Chief Technological and Operating Officer</i>
DAOR	Droit des affaires (Le-) – <i>Onrdernmingsrecht</i> (Het-)
DIV	Diagnostic <i>in vitro</i>
DLC	Date limite de consommation
EBITDA	<i>Earnings Before Interest, Taxes, Depreciations and Amortisements</i>
EMA	<i>European Medical Agency</i>
ETP	Equivalent temps plein
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FIFO	<i>First In First Out</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practices</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
GQCP	<i>Good Quality Control Practices</i>
HALPC	<i>Human Adult Liver Progenitor Cells</i>
HGC	Hybridation Génomique Comparative
hTERT	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>
HTVA	Hors taxe sur la valeur ajoutée
ICH	<i>International Conference for Harmonization</i>
Ing.-Cons.	Ingénieurs-Conseil (Revue de droit intellectuel. L'-)
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
IRDI	<i>Intellectuele Rechten</i> – Droits Intellectuels
ISO	<i>International Organization of Standardisation</i>
JLMB	Jurisprudence de Liège, Mons et Bruxelles (Revue de)
JOOEB	Journal officiel de l'Office européen des brevets
JOUE	Journal officiel de l'Union européenne
JTT	Journal des tribunaux du travail
KUL	<i>Katholieke Universiteit Leuven</i>
LBI	Loi sur les brevets d'invention
LCT	Loi relative aux contrats de travail
LOD	<i>Limit Of Detection</i>
MB	Moniteur Belge
MCH	Matériel corporel humain

N/A	Non applicable
ND	Non déterminé/non détecté
NDA	<i>Non Disclosure Agreement</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OEB	Office Européen des Brevets
OHMI	Office de l'harmonisation dans le marché intérieur
OMC	Organisation mondiale du commerce
PME	Petites et moyennes entreprises
QC	<i>Quality Control</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
R&D	Recherche et développement
ROE	Ration de rentabilité financière
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RW	Rechtskundig Weekblad
SA	Société anonyme
SCRL	Société coopérative à responsabilité limitée
SPRL	Société privée à responsabilité limitée
SRIW	Société régionale d'investissement de Wallonie
TFUE	Traité sur le fonctionnement européen
Treg	Lymphocytes T régulateurs
UCL	Université catholique de Louvain
UE	Union européenne
ULB	Université libre de Bruxelles
ULG	Université de Liège
UNamur	Université de Namur
WHO	<i>World Health Organization</i>
WIV-ISP	Institut scientifique de santé publique

Introduction

Aujourd'hui, de nouveaux espoirs de guérison émergent pour des maladies restées longtemps sans traitements adéquats. La thérapie cellulaire permettra en effet à terme de guérir des patients atteints de cancer, de diabète ou encore d'insuffisance cardiaque. Cette thérapie innovante consiste à injecter chez le malade du matériel cellulaire vivant, considéré comme « cellules-médicaments », pour permettre la régénération d'un organe endommagé.

Néanmoins, la probabilité d'apparition de cellules tumorales lors de certaines étapes du processus pourrait entraver le développement de cette nouvelle forme de thérapie en remettant en cause la sécurité du patient. Il y a donc lieu de détecter la présence de ces cellules tumorales dans les lots de « cellules-médicaments » avant de les réinjecter chez le patient malade. *Scancell* intervient dans ce processus en proposant une solution adaptée aux besoins des acteurs de la thérapie cellulaire.

Le nom du projet, *Scancell* évoque notre activité de base : l'analyse de cellules (« *scan cell* »), mais aussi, une volonté de supprimer (« *cancel* ») un risque nocif pour l'homme dans le combat de l'humain contre les maladies.

La combinaison des deux démarches académique et entrepreneuriale donne à ce document une structure un peu particulière, entre plan d'affaires et détails de nos recherches scientifiques. Nous l'avons divisé en cinq parties principales. Tout d'abord, nous allons développer la dimension interne du projet : qui nous sommes et ce qui nous réunit autour de cette problématique. Ensuite, nous irons à la découverte de l'environnement externe en détaillant l'opportunité que nous avons observée, en bons entrepreneurs schumpéteriens, et le questionnement scientifique. Après cela, le développement de notre stratégie commerciale décrira notre influence dans ce marché lacunaire. Nous expliquerons alors notre démarche concrète, via le fonctionnement quotidien de notre entreprise, inséparable d'aspects légaux qui cadreront l'aventure. Nous concluons ensuite en réalisant une prévision financière de notre stratégie, afin d'ancrer *Scancell* dans la réalité.

Mise en contexte

1.1	Genèse du projet	22
1.1.1	Démarche	22
1.1.2	Partenariat avec <i>Celyad</i>	23
1.2	Equipe	25
1.2.1	Porteurs de projet	25
1.2.2	Mentors	27
1.2.3	Aide et soutien	27

1.1 Genèse du projet

1.1.1 Démarche

L'initiative de ce projet de mémoire est née d'une collaboration entre Charlotte Bertrand et l'entreprise *Celyad* (anciennement, *Cardio3 Biosciences*). Des contacts avec cette entreprise sont nés du souhait d'approfondir les problématiques relatives à la thérapie cellulaire. Parmi plusieurs entreprises belges actives dans ce secteur contactées par Charlotte Bertrand, c'est *Celyad* qui a particulièrement retenu l'attention de notre équipe. Il s'agit d'une PME biopharmaceutique belge active dans le domaine de la thérapie cellulaire depuis une dizaine d'années. Sa mission est de transformer les recherches basées sur les cellules en traitements innovants, et ce dans le but d'améliorer la condition de patients atteints par des maladies sévères. Le portfolio actuel de cette entreprise contient deux produits :

- C-Cure®, destiné à traiter l'insuffisance cardiaque. Ce procédé, développé sur base des travaux de la *Mayo Clinic* (Etats-Unis, Rochester), consiste à prélever des cellules souches dans la moelle osseuse d'un patient puis à les reprogrammer en cellules progénitrices du cœur. Une fois injectées dans le cœur grâce à un cathéter spécialisé, développé par *Celyad* (C-Cath_{ez}®), ces cellules ont pour fonction de régénérer le tissu cardiaque endommagé suite à un infarctus ;
- la plateforme NKR-2, qui a pour but de traiter le cancer. Cette thérapie repose sur la reprogrammation des lymphocytes T, cellules tueuses du système immunitaire. Le procédé mis au point par *Celyad*, en collaboration avec le centre de recherche *Dana Farber* et l'entreprise *Celdara Medical*, consiste à y greffer un récepteur (NKG2D). Une fois réinjectés chez le patient, les lymphocytes pourront alors localiser et tuer les cellules cancéreuses de manière plus efficace.

Après une première prise de contact avec Christian Homsy, CEO (*Chief Executive Officer*) de *Celyad*, l'initiatrice du projet a pu rencontrer les responsables du département R&D (Recherche et Développement) de l'entreprise : Peter de Waele et Bernard Cornet. Plusieurs réunions ont ainsi permis de mettre en évidence une problématique rencontrée par *Celyad* et par le secteur de la thérapie cellulaire de manière générale : l'absence de tests à la fois fiables, rapides et peu coûteux pour détecter les cellules tumorales dans les échantillons destinés à l'injection chez le patient. A l'heure actuelle, *Celyad* utilise le caryotype dans ce but, et ce « faute de mieux ». Les responsables des différents départements scientifiques de *Celyad* ont en effet confirmé ne pas être satisfaits par cette méthode, pour des raisons qui seront évoquées dans le deuxième chapitre [*> 2.1 Demande*].

Pour répondre au besoin de *Celyad* – et plus généralement de la thérapie cellulaire – de disposer de méthodes pour détecter les cellules tumorales dans leurs échantillons, le projet *Scancell* a été mis sur pied.

1.1.2 Partenariat avec *Celyad*

Le partenariat que nous avons entrepris avec la société *Celyad* concerne uniquement le pôle scientifique du projet. En effet, un contrat de stage liant l'Université Catholique de Louvain (UCL) et l'entreprise a été signé par les différentes parties, afin de permettre à Charlotte Betrand de résoudre la problématique technique de ce mémoire en collaboration avec *Celyad*.

Dans le cadre de son mémoire scientifique, l'étudiante a donc travaillé dans les locaux de *Celyad* et a pu bénéficier de l'appui de son superviseur, un scientifique du département R&D de *Celyad*, Sébastien Mauën. Ce mémoire a donc consisté en l'étude de développement et/ou de la validation de cinq méthodes analytiques destinées à détecter les cellules tumorales dans les échantillons de thérapie cellulaire. Les résultats de cette étude sont disponibles en annexe [> Annexes scientifiques]. Les conclusions qui en ont été tirées, mais surtout les tests qui ont été sélectionnés, seront abordés dans le deuxième chapitre [> 2.3 Offre].

En ce qui concerne un éventuel conflit d'intérêt entre l'équipe du projet *Scancell* et l'entreprise *Celyad*, nous pouvons d'ores et déjà préciser que, dès les premiers entretiens, les équipes managériales de *Celyad* n'ont manifesté aucun souhait de commercialiser eux-mêmes les tests développés dans le cadre de cette collaboration. En effet, ceci ne correspond pas à :

- la vision de *Celyad*. Leur cœur de métier consiste à traiter des patients, et non à développer des méthodes analytiques. Selon eux, il est extrêmement important de garder le fil de cette mission, pour garantir la clarté du message transmis par la PME.
- le fonctionnement actuel du secteur. Concentrées sur le développement de leurs produits thérapeutiques, les entreprises actives sur le secteur de la thérapie cellulaire ont souvent recours à la sous-traitance et ne voient aucun intérêt à commercialiser elles-mêmes des méthodes analytiques quand d'autres acteurs pourraient les mettre à leur disposition ;
- les capacités humaines et organisationnelles de *Celyad*. En 2016, *Celyad* comprend une petite centaine d'employés. La création d'un pôle destiné au développement de méthodes analytiques impliquerait des changements au niveau de la structure organisationnelle de la PME, mais également l'engagement de nouveaux collaborateurs, modifications que les responsables de *Celyad* n'estiment pas opportunes, surtout au vu des deux contre-arguments énoncés ci-dessus.

Bien que *Celyad* ne souhaite pas commercialiser ces tests, la propriété intellectuelle sur ceux-ci leur appartient étant donné qu'ils ont été développés dans leurs laboratoires et avec l'aide de leurs scientifiques. Nous devons donc accorder une attention particulière au transfert de cette propriété ; nous y reviendrons en détails dans la quatrième partie [> 4.5 Autre protection juridique].

1.2 Equipe

Selon Reimers-Hild et Williams, un entrepreneur est une « personne capable de reconnaître et de poursuivre une opportunité, motivée par l'innovation et l'apport d'une solution à une problématique sociétale plutôt que par la génération de revenus » (Reimers-Hild & Williams 2009). De plus, les entrepreneurs possèdent quatre dénominateurs communs de personnalité : ils accordent beaucoup de valeur à l'autonomie, sont en quête de distinction par l'excellence, sont hautement optimistes et favorisent les défis à risque modéré (Business Dictionary n.d.). Même si plusieurs projets sont le fruit d'un entrepreneur individuel, le travail d'équipe est répandu et privilégié en entrepreneuriat. En effet, combiner des profils complémentaires possédant chacun leurs forces permet de créer une synergie qui augmente l'innovation et les résultats favorables (Reimers-Hild & Williams 2009).

1.2.1 Porteurs de projet

L'équipe interdisciplinaire de *Scancell* est composée de trois porteurs de projets issus de formations différentes. Leurs connaissances et compétences acquises permettent au projet de bénéficier d'expertises hautement complémentaires. Tous sont étudiants en Master à l'UCL et suivent une formation en création d'entreprise (CPME, pour Création de Petites et Moyennes Entreprises). Les porteurs de projet sont :



Charlotte BERTRAND

Scientifique

Fonction au sein de *Scancell* : CTOO

Etudiante en Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire (BBMC), elle est l'instigatrice du projet *Scancell*. Dans le cadre de son mémoire scientifique, Charlotte a pu réaliser la majeure partie du développement et de la validation des tests en laboratoire. Grâce à de multiples expériences au sein d'entreprises pharmaceutiques et à son stage de 15 mois chez *Celyad*, Charlotte possède de nombreuses connaissances quant au fonctionnement d'une entreprise de biotechnologies. Cette expérience ainsi que la rigueur de son travail sont des atouts indéniables pour le projet *Scancell*. Grâce aux enseignements de la formation CPME, Charlotte participe activement aux aspects managériaux du projet, tels que l'élaboration de la stratégie ou la mise en place de plans d'expansion géographique et de développement R&D. Capitaine de son équipe de Sport

Kin-Ball pendant presque 10 ans, Charlotte aime le travail d'équipe et sait motiver ses « troupes ». Au sein de l'entreprise *Scancell*, elle occupera la fonction de CTOO (*Chief Technology and Operating Officer*).



Antoine LOGÉ

Juriste

Fonction au sein de *Scancell* : CLO

Etudiant en Master en Droit, il est le responsable juridique du groupe. De toute évidence, il est chargé de résoudre des problématiques propres à son expertise, telles que la propriété intellectuelle ou les négociations avec *Celyad*, mais participe également à l'élaboration générale du plan d'affaires. Il est aussi le responsable communication de l'équipe. Fort de divers projets entrepreneuriaux à buts sociaux, il a en effet une grande facilité à communiquer et à transmettre la passion et la force d'un projet à des acteurs internes et externes. Membre d'une équipe de hockey, il aime travailler en équipe et est le médiateur du groupe *Scancell*. Au sein de l'entreprise *Scancell*, il occupera la fonction de CLO (*Chief Legal Officer*).



Robin PÉTRÉ

Gestionnaire

Fonction au sein de *Scancell* : CFO

Etudiant en Master en Ingénieur de Gestion à la *Louvain School of Management*, Robin est le responsable marketing et financier du groupe. Fort de plusieurs expériences dans le domaine de l'entrepreneuriat grâce à la création d'une mini-entreprise et à sa participation active à un kot à projet, il jouit de nombreuses compétences indispensables pour l'avancement de *Scancell*. Grand sportif dans l'âme, il est déterminé et aime les défis. L'entrepreneuriat est ancré en lui, puisque, depuis 80 ans, la famille Pétré est à la tête d'un commerce de primeurs et traiteur réputé à Uccle : la Maison Petré. Au sein de l'entreprise *Scancell*, il occupera le poste de CFO (*Chief Financial Officer*).

1.2.2 Mentors

Durant toute la durée de ce mémoire, nous avons pu bénéficier des conseils précieux de trois encadrants expérimentés dans le secteur de la création d'entreprises et plus précisément dans celui des biotechnologies. Ces mentors nous ont permis de transformer nos idées en une construction réaliste pour concrétiser le projet *Scancell*.

Didier CLOQUET
Expert en milieu médical

Actif depuis 10 ans dans le secteur des sciences de la santé, il est expert dans ce domaine. Pendant environ 7 ans, il a été responsable communication et membre du comité exécutif d'IBA, entreprise active sur le secteur de la technologie médicale. Depuis 2013, il occupe la fonction de directeur des ressources humaines au CHU Mont-Godinne de l'UCL. Didier Cloquet a été notre coach dans le cadre du parcours *123 GO !*.

Philippe VAN DER HOFSTADT
Spécialiste en CRO

En tant que CEO de *B&C Group* et fondateur de *BeCRO*, Philippe Van der Hofstadt constitue notre partenaire expert en matière de CRO (*Contract Research Organisations*), mais également pour tout ce qui concerne la logistique d'une entreprise de biotechnologies. Nous avons également pu bénéficier de son carnet d'adresses très fourni et varié, qui nous a été d'une aide non négligeable pour mener à bien notre étude de marché.

Pierre LE RIGOLEUR
Conseiller en thérapie cellulaire

Diplômé de la 15^e promotion de la formation CPME de l'UCL, il a réalisé son mémoire sur la création d'un produit de thérapie cellulaire. Sa connaissance approfondie du secteur a donc un grand intérêt pour les porteurs de projet. De plus, grâce à son expérience de la formation CPME, il nous a aidés à relever des défis qui y sont propres pour la construction du projet *Scancell*.

1.2.3 Aide et soutien

Dans cette section, nous nous attarderons sur l'ensemble des soutiens que nous avons pu recevoir au cours de l'aventure académique *Scancell*, mais également sur les

acteurs plus spécifiques qui auront une importance dans notre future entreprise.

Tout d’abord, le projet *Scancell* a considérablement avancé suite à la participation de l’équipe à différents événements et concours. Entre février 2015 et juin 2016, nous avons effectivement présenté le projet à un public varié, lors de six événements entrepreneuriaux :

- les forums *Mind & Market* de 2015 et de 2016. En 2015, nous avons défendu le projet et avons obtenu le premier prix dans la catégorie « La meilleure idée ». En 2016, le projet a été présenté par l’équipe dans la catégorie « Elle est longue la route » ;
- la *Start Academy*, organisée par la Solvay Business School de l’Université Libre de Bruxelles (ULB), pour laquelle nous avons atteint les demi-finales ;
- le concours *Inno Pépites Junior*, organisé par La Maison de l’Entreprise (LME) à Mons, duquel nous sommes sortis demi-finalistes ;
- le parcours *123 GO !*, coordonné par le Centre d’Entreprise et d’Innovation (CEI) de Louvain-la-Neuve et l’organisme Nuyko.
- la présentation à la Chambre de Commerce et Union des Entreprises de Bruxelles (BECI), où nous avons été primés parmi les autres projets CPME.

Durant tout le parcours entrepreneurial de mise en place du projet *Scancell*, nous avons tout naturellement bénéficié de l’encadrement de la formation CPME de l’UCL. Au travers de diverses sessions formatives, nous avons ainsi pu rencontrer un grand nombre d’entrepreneurs aguerris et spécialisés.

Plusieurs acteurs rencontrés dans le cadre de la construction de notre projet académique pourront également occuper une place plus ou moins importante au sein de notre future entreprise. Tout d’abord, des acteurs liés au financement de notre projet, tels que *MyMicroInvest*, *BeAngels* ou encore les organisations de capital à risque, pourront siéger au sein du conseil d’administration. L’importance de ces organismes et leur place au sein de l’entreprise *Scancell* seront détaillées dans le cinquième chapitre [> 5.3 Financement]. Le second acteur d’importance pour notre future entreprise est incarné par les entreprises de consultance en biotechnologies auxquelles nous avons et/ou ferons appel. Parmi celles-ci, *WBC Incubator* jouera un rôle particulier au travers de la mesure « CxO » proposée par la *Sowalfin*, la Société wallonne de financement et de garantie des petites et moyennes entreprises. Finalement, *Biowin*, le pôle de compétitivité santé de Wallonie, interviendra dans notre structure entrepreneuriale. Nous reviendrons sur les différents rôles de ces institutions au long de ce mémoire, notamment dans le deuxième chapitre [> 2.4 Environnement].

Opportunité

2.1	Demande	30
2.1.1	Demande générale : évaluation de la tumorigénicité <i>in vitro</i> . .	30
2.1.2	Demande spécifique : la thérapie cellulaire	36
2.2	Marché de la thérapie cellulaire	40
2.2.1	Situation globale	40
2.2.2	Acteurs aux potentiel économique inégal	40
2.2.3	Cas particulier : CMO et CDMO	43
2.3	Offre	44
2.3.1	Concept d'immortalité répliquative	44
2.3.2	Test limite <i>vs</i> test quantitatif	46
2.3.3	Tests	48
2.3.4	Avantages compétitifs.	56
2.3.5	Création de valeur.	59
2.4	Macro-environnement	60
2.4.1	Environnement politique	61
2.4.2	Environnement économique	63
2.4.3	Environnement social	64
2.4.4	Environnement légal	66
2.4.5	Environnement technologique	66
2.4.6	Environnement écologique	67
2.4.7	Variables pivots	68
2.5	Micro-environnement	70
2.5.1	Intensité concurrentielle	70
2.5.2	Menace des produits de substitution.	73

2.5.3	Menace des nouveaux entrants	73
2.5.4	Pouvoir de négociation des fournisseurs.	74
2.5.5	Pouvoir de négociation des clients	75
2.5.6	(+1) Pouvoir public	76

2.1 Demande

2.1.1 Demande générale : évaluation de la tumorigénicité *in vitro*

Scancell entend répondre à la problématique générale des tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro*.

Au contraire des expériences *in vivo*, où l'organisme vivant est utilisé dans sa globalité (Autoimmunity Research Foundation n.d.), le terme « *in vitro* » indique que ce genre de méthodes analytiques est réalisé dans un environnement expérimental contrôlé, en dehors d'un organisme vivant. Plus précisément, ces tests sont effectués à partir d'un échantillon cellulaire. La tumorigénicité (ou potentiel tumorigène), quant à elle, peut être définie comme la capacité d'un échantillon cellulaire à donner naissance au sein d'un organisme vivant à une tumeur bénigne ou maligne, alors appelée cancer (Frandsen et al. 2001). Pour évaluer la tumorigénicité d'un échantillon de cellules, des paramètres propres aux cellules tumorales peuvent y être analysées. Ainsi, ce genre de tests permet de déterminer si un échantillon contient ou non des cellules à caractéristique(s) tumorale(s). Par souci de simplification, nous dirons dans ce document qu'il s'agit de tests de détection des cellules tumorales.

La détection des cellules tumorales s'insère dans un domaine particulier, celui du diagnostic *in vitro*. Aux niveaux belge et européen, la législation définit le diagnostic *in vitro* comme « tout dispositif (...) qui consiste en un réactif, un matériau d'étalonnage, un matériau de contrôle, une trousse, un instrument, un appareil, un équipement ou un système, utilisé seul ou en combinaison, destiné par le fabricant à être utilisé *in vitro* dans l'examen d'échantillons provenant du corps humain (...) dans le but de fournir une information concernant un état physiologique ou pathologique, une anomalie congénitale ou encore permettant de contrôler des mesures thérapeutiques » (art. 1, §2, 2°, AR, 14 novembre 2001 ; art. 1, 2, b, Directive 98/79/CE).

A l'heure actuelle, quatre tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* sont présents sur le marché :

- *Le caryotype*

Le caryotype est une représentation visuelle des chromosomes au sein d'une cellule. Après isolation, les chromosomes sont colorés afin de leur conférer un motif particulier. Grâce à ce code, ils sont appariés et les paires sont finalement classées en fonction de leur taille. *In fine*, cette technique permet d'observer les anomalies macroscopiques présentes sur les chromosomes d'une cellule donnée (Saldarriaga et al. 2015 ; National Genetics and Genomics Education Center (NHS) n.d.). Celles-ci peuvent être des inversions ou translocations (échange d'une région d'ADN entre deux chromosomes au sein d'une même paire ou entre deux paires différentes), des substitutions (transfert d'une région d'ADN d'un chromosome à l'autre), des délétions (perte d'une région d'ADN au sein d'un chromosome) ou encore des duplications (gain d'une région d'ADN au sein d'un chromosome). Il peut également s'agir de la perte ou du gain d'un chromosome entier (National Human Genome Research Institute n.d.).

Pour évaluer la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire, le caryotype présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, il se base sur un mécanisme de tumorigénicité qui n'est pas universel. En effet, il repose sur le fait que l'apparition d'anomalies chromosomiques macroscopiques provoque la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale. Or, toutes les cellules tumorales ne présentent pas d'anomalies sur leurs chromosomes (autrement dit, leur apparition n'est pas indispensable pour qu'une cellule devienne tumorale) (Lobo 2008 ; Heim Sverre and Mitelman Felix 2009). De ce fait, ce test ne pourra pas détecter les cellules qui sont devenues tumorales sans avoir acquis d'anomalies chromosomiques macroscopiques ; on parle de résultat « faux négatif » (c'est-à-dire qui affirme que la cellule n'est pas tumorale alors qu'en réalité elle l'est). A l'inverse, le caryotype peut également fournir des résultats « faux positifs » (il affirme que la cellule est tumorale alors qu'en réalité elle ne l'est pas), dû au fait qu'une cellule peut présenter des anomalies chromosomiques anodines et rester saine (Lobo 2008). Le deuxième inconvénient du caryotype est sa limite de détection (LOD), qui est élevée. La limite de détection est la plus petite quantité de cellules tumorales qui peut être détectée par le test. Elle est révélatrice de la sensibilité du test ; plus la limite de détection est faible, plus la sensibilité est élevée. La limite de détection du caryotype est de 10%, ce qui signifie qu'un échantillon doit contenir au minimum 10% de cellules tumorales pour que le résultat soit positif. En résumé, parce qu'il fournit un résultat incomplet et que sa sensibilité est relativement faible, la fiabilité du test caryotype peut être remise en cause.

Sur le plan commercial, ce test est peu attrayant, et ce pour deux raisons principales : sa complexité de réalisation et l'exigence d'une expertise particulière ; c'est pourquoi, le caryotype n'est proposé sur le marché que sous la forme d'un service qui prend énormément de temps (1 mois) et coûte cher (2 000 € par échantillon)¹.

- *L'hybridation génomique comparative (HGC)*

Tout comme le caryotype, le test HGC a pour but d'observer les anomalies chromosomiques. Plus précisément, il analyse les variations du nombre de copies chromosomiques d'un segment d'ADN particulier qui peuvent avoir lieu suite à l'apparition d'anomalies chromosomiques asymétriques (comme des délétions ou des duplications) (Saldarriaga et al. 2015). Ce test permet d'analyser simultanément la variation du nombre de copies de plusieurs milliers de segments d'ADN différents, par l'utilisation d'une micro-puce biologique. Puisqu'il repose sur un principe similaire à celui du caryotype, il pâtit du même manque de fiabilité (mécanisme non-universel). De plus, sa limite de détection est également relativement élevée (8%) (Valli et al. 2011).

D'un point de vue commercial, le test HGC est légèrement plus attractif que le caryotype car, pour un prix identique à ce dernier (2 000 € par micro-puce), les résultats sont obtenus plus rapidement (2 à 3 semaines).

- *Le séquençage*

Alors que le caryotype et le test HGC s'intéressent aux anomalies chromosomiques macroscopiques, le séquençage s'attache à la détection des anomalies qui se situent à l'échelle microscopique, c'est-à-dire au niveau de la séquence d'ADN. En déterminant l'ordre précis des nucléotides, unités de base de l'ADN, au sein d'une molécule d'ADN, le séquençage permet d'identifier les mutations qui s'y trouvent. Plusieurs méthodes existent et permettent d'obtenir la séquence de tous les gènes (génomique) ou de certains gènes (séquençage ciblé) d'un organisme (Dewey et al. 2012). Dans le cadre de l'évaluation de la tumorigénicité, sont utilisées des micro-puces biologiques permettant l'analyse simultanée d'une série de gènes d'intérêt, fréquemment mutés dans les cellules tumorales.

Bien que la sensibilité de ce test soit acceptable (1%), il génère des faux négatifs – la présence de mutations n'étant pas une caractéristique universelle des cellules tumorales – et des faux positifs – une cellule pouvant rester saine malgré la présence de mutations. L'utilisation du test de séquençage pour détecter les cellules tumorales ne fournit donc

1. La durée ainsi que le coût des tests et de certains équipements, cités dans l'ensemble de ce document, sont le fruit d'une analyse comparative et/ou de données internes aux entreprises de thérapie cellulaire contactées dans le cadre des études de marché qualitatives et quantitatives.

pas un résultat entièrement fiable. De plus, il n'est proposé qu'en tant que service. Par conséquent, il prend du temps (2 à 3 semaines) et son prix est également élevé (2 000 € par micro-puce).

- *Le soft agar*

Finalement, le soft agar repose sur le principe de croissance indépendante de l'ancrage, c'est-à-dire la capacité unique des cellules tumorales à pousser dans un milieu semi-solide et donc sans adhérer à une surface. Ainsi, l'échantillon cellulaire à analyser est cultivé dans une gélose (constituée en partie d'agar) pendant plusieurs jours. Dans cet environnement, seules les cellules tumorales sont capables de proliférer. Leur croissance est alors quantifiée par l'ajout d'une molécule qui sera métabolisée par les cellules tumorales. Le signal colorimétrique émis suite à la transformation de ce composé est représentatif de la proportion de cellules tumorales présentes initialement dans l'échantillon (Borowicz et al. 2014).

Le test de soft agar n'est pas non plus basé sur un mécanisme universel de tumorigénicité, la croissance indépendante de l'ancrage étant une caractéristique des cellules tumorales invasives et métastatiques, c'est-à-dire susceptibles de former des métastases (Mori et al. 2009). Par contre, ce test ne génère théoriquement pas de faux positifs. En effet, une cellule ne peut pas être saine si elle a acquis la capacité de croissance indépendante de l'ancrage. Cependant, le principal problème de cette méthode analytique est sa très faible sensibilité. Une étude expérimentale réalisée dans le cadre de ce mémoire a en effet permis de fixer sa limite de détection à 37,5% [*> Annexes scientifiques*]. Son attractivité commerciale, quant à elle, est mitigée car même si le soft agar est proposé à un prix abordable (350 € par échantillon, avec un coût moyen de 13 000 € pour l'acquisition des machines nécessaires au test), son procédé est relativement long (de 10 à 30 jours, en fonction des protocoles).

Comme nous venons de le voir, aucune méthode existante d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* n'est satisfaisante. Au niveau scientifique, elles présentent des inconvénients majeurs qui remettent en cause leur fiabilité. Premièrement, toutes se basent sur des mécanismes ou caractéristiques qui ne sont pas universellement présents dans tous les types de cellules tumorales. D'un point de vue conceptuel, elles ne permettent donc pas de déterminer avec certitude si un échantillon contient des cellules tumorales. Ensuite, la limite de détection de certaines d'entre elles est relativement élevée, ce qui implique que les tests concernés sont peu sensibles (caryotype, HGC et soft agar). De ce fait, les échantillons qui ne contiennent qu'une faible proportion de cellules tumorales apparaîtront comme négatifs alors qu'ils renferment une quantité non négligeable de cellules tumorales. En plus de leur manque de fiabilité, la plupart des

techniques actuelles de détection des cellules tumorales *in vitro* sont commercialement peu séduisantes parce qu'elles sont chères et/ou prennent beaucoup de temps.

Les quatre tests présentés ci-dessus sont des méthodes reposant sur des caractéristiques générales des cellules tumorales, ce que l'on appelle les « marqueurs du cancer » (qui sont détaillés en annexe [[> Annexes scientifiques](#)]). Une multitude d'autres tests d'identification des cellules tumorales existent, mais ne sont pas pertinents pour l'évaluation de la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire. En effet, ces méthodes analysent des propriétés partagées uniquement par un ou plusieurs types tumoraux. Leur spécificité diminue donc fortement leur fiabilité dans le cadre de la détection *in vitro* de toutes les cellules tumorales d'un échantillon. Pour cette raison, elles trouvent un usage plus courant dans le cadre du dépistage du cancer.

Quoi qu'il en soit, *Scancell* répond parfaitement à la problématique de détection *in vitro* des cellules tumorales en lançant sur le marché un nouvel outil pour évaluer la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire – Telocell – qui consiste en la combinaison de trois méthodes analytiques construites et développées par l'équipe scientifique du projet. Sur la plateforme actuelle de tumorigénicité, Telocell offre le meilleur rapport fiabilité/attractivité, car il est plus fiable (tant par son principe que par sa sensibilité) que les méthodes présentées ci-dessus, pour une durée inférieure et un prix avantageux.

Tableau 2.1 – Tableau comparatif des méthodes existantes pour l'évaluation de la tumorigénicité *in vitro*.

TESTS	FRÉQUENCE EN THÉRAPIE CELLULAIRE	PRINCIPE	MÉCANISME UNIVERSEL	LOD	FACILITÉ D'EXÉCUTION	FORME	DURÉE	PRIX PAR ÉCHANTILLON
Caryotype	100%	Anomalies chromosomiques macroscopiques	Non	10%	Complexe	Service	1 mois	2 000€
HGC	25%	Variations du nombre de copies chromosomiques	Non	8%	Complexe	Service	2-3 semaines	2 000€
Séquençage	25%	Mutations au niveau de la séquence d'ADN	Non	1%	Simple	Service	2-3 semaines	2 000€
Soft agar	50%	Croissance indépendante de l'ancrage	Non	37,5%	Simple	Kit	10-30 jours	350€
Telocell	N/A	Immortalité répliquative	Oui	1 ; 5,5%	Simple	Service	1 semaine	900€
						Kit	1 jour	1 000€

2.1.2 Demande spécifique : la thérapie cellulaire

Grâce à plusieurs rencontres avec l'entreprise *Celyad*, les porteurs de projet de *Scancell* ont identifié dans le secteur de la thérapie cellulaire le besoin d'un test permettant une détection fiable mais également rapide et peu onéreuse des cellules tumorales *in vitro*. Dans cette section, nous verrons d'abord en quoi consiste ce genre de thérapies mais également les acteurs qui constituent ce secteur. Ce cheminement nous permettra d'identifier dans quel cadre chacun de ces acteurs doit disposer de tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro*.

- *La thérapie cellulaire : définition et concepts*

La thérapie cellulaire (ou cytothérapie) est une nouvelle forme de thérapie au cours de laquelle du matériel cellulaire vivant est injecté chez un patient (U.S. Food and Drug Administration 2014). Parce qu'elles constituent le traitement du patient, les cellules qui lui sont injectées peuvent être qualifiées de « cellules-médicaments ».

Les « cellules-médicaments » peuvent être obtenues à partir de différents types cellulaires, prélevés directement chez un patient ou une personne saine :

- les cellules souches. Il s'agit de cellules indifférenciées qui sont capables de donner naissance à des types cellulaires variés (tels que, par exemple, des cellules du cœur ou de la peau). Celles-ci peuvent être prélevées à partir des tissus embryonnaires (comme le cordon ombilical) ou dans certaines régions du corps humain adulte (comme la moelle osseuse ou le tissu adipeux). Dans le second cas, on parle de cellules souches adultes (National Institutes of Health n.d.) ;
- les cellules différenciées, c'est-à-dire les cellules qui constituent les unités fonctionnelles de nos tissus et organes. Il peut s'agir par exemple de cellules d'os, de foie ou encore de muscle.

En fonction de leur origine, des objectifs poursuivis et du protocole considéré pour la thérapie cellulaire envisagée, les « cellules-médicaments » peuvent être obtenues grâce à différents procédés. La plupart des cytothérapies permettent la régénération d'un organe endommagé (thérapie cellulaire régénératrice). Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être utilisées (American Society of Gene and Cell Therapy n.d.) :

- les cellules souches peuvent être utilisées telles quelles pour leur capacité de différenciation et leur potentiel de division cellulaire ;
- les cellules souches peuvent être reprogrammées dans le but d'obtenir des cellules progénitrices d'un organe particulier ;
- les cellules différenciées peuvent être reprogrammées en cellules souches (c'est ce qu'on appelle la dédifférenciation), alors appelées iPSC (pour « *induced pluripotent stem cells* »).

D'autres cythérapies visent à soigner des maladies causées par un dysfonctionnement de la cellule en raison d'une ou plusieurs lésions géniques (mutations, perte d'un gène, etc.). Pour cela, le matériel cellulaire à injecter (cellules souches, différenciées, iPSC) est génétiquement modifié, généralement par l'introduction d'un « gène-médicament ». Dans ce cas, on parle de thérapie génique (American Society of Gene and Cell Therapy n.d.). Finalement, la thérapie cellulaire peut être classée en deux catégories en fonction de son schéma d'administration. Lorsque les cellules sont injectées au patient chez qui elles ont été prélevées, on parle de thérapie autologue. Par contre, lorsque le matériel cellulaire est prélevé chez un patient/une personne saine et injecté chez plusieurs patients différents, il s'agit de thérapie allogénique (Malik 2012). Un sous-type de thérapie allogénique consiste à injecter chez des patients malades des cellules issues d'un animal (thérapie xénogénique) (Edge 1998).

- *Les trois acteurs de la thérapie cellulaire et leurs besoins*

Le secteur des thérapies cellulaires comprend trois acteurs, intrinsèquement liés par le processus de développement de ce genre de thérapies.

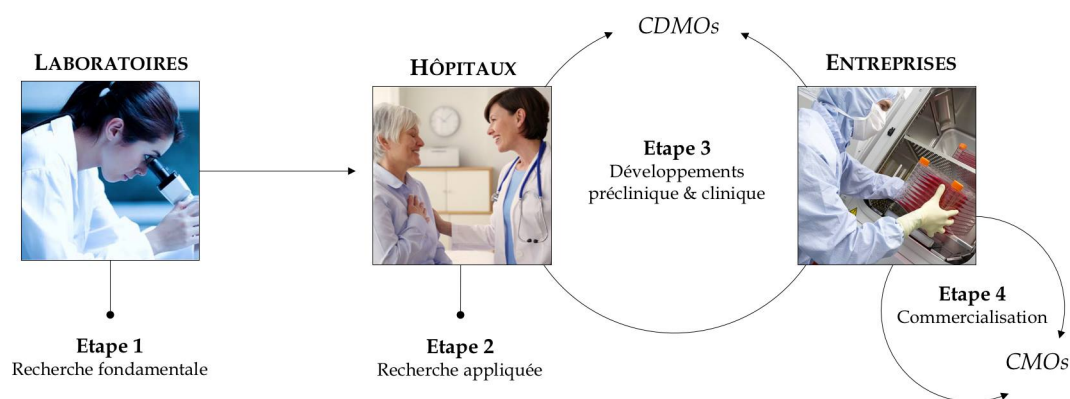


FIGURE 2.1 – Processus de développement d'une thérapie cellulaire, de la recherche fondamentale en laboratoire à la commercialisation par les entreprises.

L'acteur le plus en amont de la chaîne de développement est incarné par les laboratoires et les centres de recherche dont l'activité de base est la recherche fondamentale. Autrement dit, ils entreprennent des travaux expérimentaux dans le but d'acquérir de nouvelles connaissances sur les fondements des thérapies basées sur l'utilisation de cellules (Figure 2.1, étape 1). Plus précisément, certains laboratoires s'intéressent aux mécanismes de transformation des cellules souches, c'est-à-dire le mécanisme par lequel une cellule souche peut devenir tumorale. Ils permettent donc, indirectement, d'évaluer le risque lié à leur utilisation en thérapie cellulaire. Pour assurer ce genre d'études, les centres de recherche doivent disposer de tests d'évaluation *in vitro* de la tumorigénicité.

Le savoir acquis grâce aux recherches réalisées par les laboratoires est alors transféré aux hôpitaux qui initient le développement d'une nouvelle thérapie cellulaire (Figure 2.1, étape 2). Dans ce cas, on parle de recherche appliquée puisque les connaissances acquises grâce à la recherche fondamentale sont utilisées dans un but précis. Finalement, le savoir-faire développé par les hôpitaux est transmis aux entreprises qui prennent alors en charge l'entièreté du processus de développement (Figure 2.1, étape 3) et de mise sur le marché (Figure 2.1, étape 4) de cette nouvelle thérapie cellulaire. Ce processus implique un transfert de technologie et donc une véritable collaboration entre l'entreprise et l'hôpital où une thérapie cellulaire donnée est née. De plus, le développement et la commercialisation d'un nouveau produit de thérapie cellulaire peuvent être réalisés en partenariat avec des entreprises sous-traitantes, les C(D)MO, dont nous expliquerons le rôle plus précis dans une section suivante [> 2.2 Marché de la thérapie cellulaire]. Pour ces acteurs, les tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* sont des outils de sécurité thérapeutique. En effet, lors de leur processus d'acquisition de savoir-faire, les hôpitaux ont recours à des tests *in vivo* chez l'humain, qui impliquent donc l'injection de « cellules-médicaments ». Les entreprises, quant à elles, doivent également injecter des « cellules-médicaments » aux patients (d'abord lors des essais cliniques, puis une fois que le produit est commercialisé). Elles doivent donc minimiser le risque lié à ce genre d'injection.

Que ce soit en phase de test ou après commercialisation, les échantillons de « cellules-médicaments » doivent être soumis à une série d'analyses obligatoires avant de pouvoir être injectées. Ces analyses font partie intégrante du contrôle qualité (QC, pour « *quality control* ») du produit de thérapie cellulaire, elles sont imposées par des organismes de régulation de l'industrie (bio)pharmaceutique comme la FDA (*Food and Drug Administration*) aux Etats-Unis, l'EMA (*European Medicine Agency*) en Europe, ou encore l'AFMPS (Agence Fédérale du Médicament et des Produits de Santé) en Belgique, et consistent à vérifier que plusieurs paramètres du produit de thérapie cellulaire sont respectés. Ainsi, on évalue l'identité, la pureté, la stérilité, la potentialité, la viabilité et la sécurité du produit de thérapie cellulaire. Pour ce faire, plusieurs échantillons représentatifs de l'entièreté du produit de thérapie cellulaire sont prélevés à partir du stock de « cellules-médicaments » et sont soumis à plusieurs tests. En fonction des résultats obtenus pour ces analyses, une décision pourra être prise en ce qui concerne la libération, c'est-à-dire l'autorisation d'injection également appelée « *release* », d'un lot de « cellules-médicaments ». Dans le jargon médical, ces analyses réglementaires sont nommées « tests de *release* » (U.S. Food and Drug Administration 2014). Le caractère réglementaire des tests de *release* implique qu'ils soient accrédités par les autorités ; nous y accorderons un intérêt tout particulier dans le troisième chapitre [> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases].

Dans le contexte de libération d'un lot de thérapie cellulaire, les tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* interviennent lors de l'analyse du critère de « sécurité ». En effet, pour qu'un lot soit libéré, il ne doit pas contenir de cellules tumorales. La possibilité d'apparition de cellules tumorales dans les échantillons de thérapie cellulaire a été mise en évidence suite à la publication de quelques études rapportant que les cellules souches mésenchymateuses (à la base de la majorité des thérapies cellulaires régénératrices) peuvent se transformer lorsqu'elles sont cultivées pendant une période relativement longue (Røsland et al. 2009 ; Rubio et al. 2005), ce qui est le cas lorsqu'elles sont soumises au procédé de fabrication des « cellules-médicaments ». Ce genre d'analyses permet donc d'assurer la sécurité du patient, en diminuant le risque que lui soient injectées des cellules à caractère tumoral. Plusieurs études réalisées chez la souris ont en effet montré que l'injection sous-cutanée de cellules tumorales peut, dans certains cas, provoquer le développement d'une tumeur (bénigne ou maligne) *in vivo*. Ce phénomène dépend notamment du lieu d'injection, de l'agressivité du type tumoral qui est injecté ou encore de l'efficacité du système immunitaire (Heindryckx et al. 2009 ; Qiu & Su 2013). Aucune étude n'ayant été réalisée chez l'humain, il n'a, à ce jour, pas encore été prouvé que l'injection de cellules tumorales pouvait provoquer le développement d'un cancer chez le patient. Cependant, étant donné que ce risque a été identifié chez l'animal, nous avons très peu de raisons de penser que ce phénomène pourrait ne pas se reproduire chez l'Homme. Pour cette raison, l'évaluation du potentiel tumorigène des échantillons de thérapie cellulaire est donc réalisée par prévention.

Une étude de marché réalisée auprès des entreprises de thérapie cellulaire en Belgique a révélé que celles-ci utilisent toutes le caryotype pour l'évaluation de la tumorigénicité *in vitro*. Pour les autorités de la santé, ce test incarne depuis plusieurs années un standard dans l'évaluation de la tumorigénicité d'un échantillon. Sur l'ensemble des acteurs interrogés, 100% déclarent ne pas être entièrement satisfaits par le caryotype, pour les raisons qui ont été évoquées ci-dessus. Pour pallier un manque de fiabilité, les entreprises ont donc souvent recours à l'utilisation de plusieurs techniques ce qui, *de facto*, augmente fortement le coût de l'évaluation de la tumorigénicité de leurs échantillons. Parmi les entreprises ayant accepté de nous révéler cette information, 50% utilisent le soft agar en complément du caryotype, 25% utilisent le séquençage et 25% le test HGC [> Annexe B Etude de marché].

2.2 Marché de la thérapie cellulaire

2.2.1 Situation globale

Parmi les nombreux secteurs industriels pour qui la détection de cellules tumorales est pertinente, rendant les tests de *Scancell* applicables, nous avons choisi de nous concentrer sur celui de la thérapie cellulaire, comme nous l'avons défini dans le début de ce chapitre [> 2.1 Demande]. En effet, la demande de tests d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* y est plus importante que dans d'autres secteurs de l'industrie (bio)pharmaceutique. Ceci est principalement dû au fait qu'il s'agit d'un secteur relativement récent (les entreprises se développent depuis une dizaine d'années seulement en Belgique). Ses acteurs privilégient donc le développement de leur traitement à la mise au point de nouvelles techniques d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro*. En mettant sur pied Telocell, premier produit de *Scancell*, nous le faisons à leur place.

Ainsi, le secteur de la thérapie cellulaire présente une réelle opportunité pour *Scancell*. En effet, sa nouveauté fait que les acteurs de ce secteur n'ont pas encore de partenaires définitivement établis ; nous pourrions donc nous y implanter plus rapidement que sur un autre marché. Par ailleurs, il s'agit d'un secteur en pleine expansion, ce qui nous permettra de faire grandir l'entreprise *Scancell*. Finalement, le besoin d'un test fiable, rapide et peu coûteux de détection des cellules tumorales *in vitro* est présent chez tous les acteurs de la chaîne de ce secteur.

De plus, la Belgique en particulier est très influente dans le domaine de la thérapie cellulaire en Europe puisque, même si elle ne contient pas le plus grand nombre d'entreprises, elle rassemble les plus avancées d'entre elles. Ce pays est même considéré par certains spécialistes comme la « *cell therapy valley* » (Co-ACT 2013). Nous détaillerons la densité d'entreprises actives au point suivant. A moyen terme, elles pourraient soigner plusieurs centaines de millions de patients européens à elles seules (Tableau 2.2).

2.2.2 Acteurs aux potentiel économique inégal

Tous les acteurs de la thérapie cellulaire ne présentent pas le même potentiel d'intérêt pour notre entreprise. Les laboratoires en recherche fondamentale [> Annexe B Etude de marché] n'ont par exemple pas les mêmes obligations du point de vue de la sécurité, et n'utilisent donc pas forcément les tests de détection de cellules tumorales de la même manière, ce qui permet à certains d'entre eux de développer leurs propres solutions moins onéreuses.

Les hôpitaux et les entreprises par contre sont les plus grands consommateurs de tests de *release*, grâce à leur importante activité d'injection *in vivo* qui exige nécessairement

une plus grande sécurité pour garantir la santé des patients. La liste de ces hôpitaux [> Annexe B Etude de marché] est définie par la loi (loi du 19 décembre 2008), en raison de leur utilisation de matériel corporel humain que nous développerons dans l'analyse du macro-environnement [> 2.4 Macro-environnement].

Les entreprises de la thérapie cellulaire en Belgique, sont au nombre de dix, mais parmi celles-ci, seule *Tigenix* possède actuellement un produit sur le marché. D'ici 2020, on peut cependant s'attendre à la commercialisation de huit nouveaux produits (voir Tableau 2.2), dont la date précise dépendra des différentes procédures de l'AFMPS et de l'EMA. Le détail des différentes phases de développement de ces produits en Belgique se trouve dans en annexe [> Annexe B Etude de marché].

Tableau 2.2 – Produits belges de la thérapie cellulaire. Le tableau présente les différents produits dont le contrôle qualité est réalisé en Belgique qui seront commercialisés d'ici 2020. Le nombre de patients traités par an a été calculé par l'estimation de la part de marché de ces entreprises (Rapports d'actionnaire).

PRODUIT	ENTREPRISE	TYPE	TAILLE DU MARCHÉ (UE)	NOMBRE DE PATIENTS TRAITÉS PAR AN	COMMERCIALI- SATION
<i>C-Cure®</i>	<i>Celyad</i>	Autologue	2,3 millions	46 000	2017
<i>HepaStem</i>	<i>Promethera</i>	Allogénique	18 000	900	2017
<i>Cx601</i>	<i>Tigenix</i>	Allogénique	100 000	2000	2018
<i>Preob</i>	<i>Bone Therapeutics</i>	Autologue	10 millions	50 000	2019
<i>Multistem</i>	<i>Athersys (Masthercell)</i>	Allogénique	2 millions	20 000	2019
<i>Ovasave</i>	<i>TxCell (Masthercell)</i>	Autologue	120 000	2400	2019
<i>Creost</i>	<i>Novadip</i>	Autologue	25 000	500	2020
<i>CX611</i>	<i>Tigenix</i>	Allogénique	150 000	3000	2020

Outre cette liste de clients potentiels, nous devons également ajouter tous les patients issus des phases d'essais cliniques initiés par ces mêmes entreprises. Ces essais cliniques représentent entre 100 et 250 patients en tout ; ils sont indispensables pour l'accord de mise sur le marché délivrée par l'AFMPS et l'EMA. Ils sont constitués de trois phases, qui permettront *in fine* de garantir la sécurité et l'efficacité des produits développés. En Belgique, sur la période 2005-2011, en moyenne 59 patients ont été recrutés par phase (EMA 2013), en sachant que la troisième phase engage beaucoup plus de personnes que la première.

En 2015, 484 études cliniques ont été lancées en Belgique (Belga 2016), pour une augmentation de 6% par rapport à l'année précédente, ce qui permet à notre pays de garder sa première place européenne d'innovation thérapeutique en nombre d'essais cliniques menés (Belga 2016). Attention, ce nombre comprend toutes les études concernant les médicaments à destination de l'humain, donc pas uniquement la thérapie cellulaire mais aussi les produits d'entreprises pharmaceutiques traditionnelles. Cependant, en nous basant sur le ratio 5/100 des Etats-Unis (FDA 2015), qui signifie que pour le lancement de cent études cliniques, seules cinq d'entre elles concernent des thérapies « avancées » - les thérapies géniques, cellulaires ou tissulaires -, nous pouvons estimer à vingt-quatre le nombre d'études cliniques à venir l'année en 2017 en Belgique.

En gardant le même taux de croissance, et le nombre de patients moyens recrutés par phase, ainsi qu'en rassemblant les informations liées à la commercialisation des produits, nous obtenons l'estimation suivante du nombre de patients traités au cours des prochaines années (Tableau 2.2).

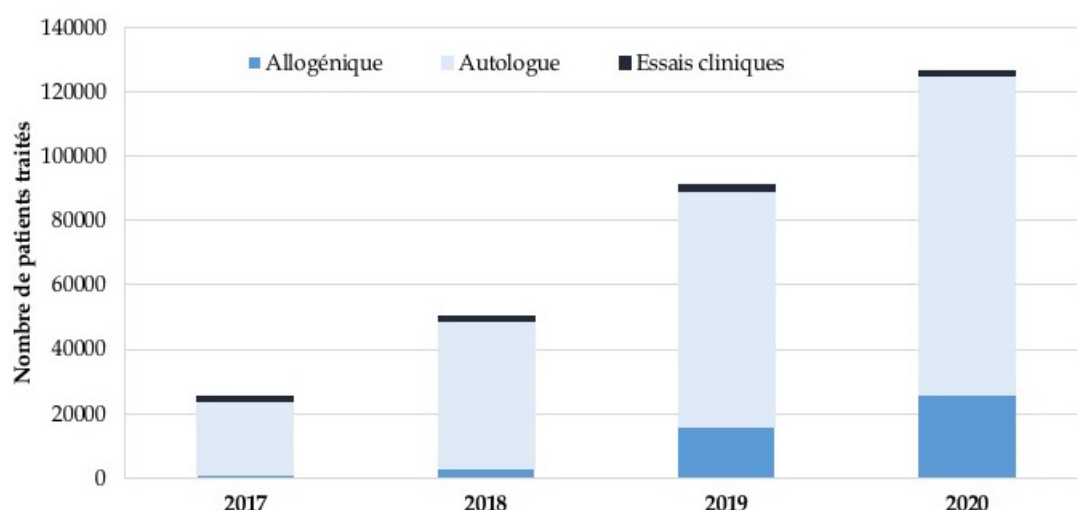


FIGURE 2.2 – Evolution du marché de la thérapie cellulaire belge. La figure présente l'évolution du nombre de patients traités par les entreprises de thérapie cellulaire d'ici 2020, à l'échelle européenne (Rapports d'actionnaire ; EMA 2015).

2.2.3 Cas particulier : CMO et CDMO

Deux types d'entreprises concernées nous intéressent particulièrement, les CMO, pour « *contract manufacturing organizations* » et les CDMO, « *contract development and manufacturing organizations* ».

D'un côté, les CMO sont des entreprises proposant des services de production avec des volumes de capacité variable (faibles pour la R&D préclinique jusqu'à une production plus importante pour les essais cliniques et la commercialisation). De telles entreprises existent dans le secteur de la thérapie cellulaire et agissent de manière équivalente à des sous-traitants. En effet, les CMO ne développent pas en tant que tels des nouveaux produits de thérapie cellulaire mais se limitent à trouver des accords avec les entreprises développant de tels produits. Les CMO se contentent d'en assurer la production. Par exemple, une fois qu'une entreprise comme *Promethera* ou *Bone Therapeutics* a développé et validé son produit, elle peut négocier avec des CMO qui à leur tour produiront les « cellules-médicaments » en respectant le processus de production mis au point par l'entreprise commanditaire, ce que nous confiaient ces deux entreprises lors d'un entretien.

D'autre part, les CDMO sont des entreprises proposant non seulement des services de production, de manière équivalente aux CMO, mais aussi un service de développement de produit. A la demande du client, ils peuvent finir un développement, optimiser la production, etc. Mis à part cette différence, leur fonctionnement est identique à celui des CMO.

Afin de proposer un service complet, les CMO et CDMO proposent en général, outre leurs services de base respectifs, la réalisation de tous les tests de contrôle de qualité avant injection au patient. C'est cette particularité qui est intéressante pour *Scancell*. En effet, une CMO ayant une grande capacité de production va répondre aux besoins de plusieurs entreprises ayant développé un produit de thérapie cellulaire. Avoir comme client des CMO ou CDMO permet donc au final de toucher un nombre d'entreprises nettement plus important que par l'approche directe préconisée auparavant. Actuellement en Belgique, seule une CDMO de ce type, *Masthercell*, a déjà pu négocier des contrats avec des entreprises développant des produits de thérapie cellulaire. *Masthercell* a déjà des accords de production avec quatre entreprises, pas seulement belges, ce qui augmente la taille du marché potentiel. Les prévisions de commercialisation de ces entreprises ont déjà été comptabilisées dans nos tableaux récapitulatifs du marché de la sous-section précédente.

Les CMO et CDMO possèdent au final pour *Scancell* un statut un peu ambigu, entre client et concurrent, que nous développerons dans l'analyse du micro-environnement [> 2.5 Micro-environnement].

2.3 Offre

Pour répondre à un besoin actuellement insatisfait – à savoir la présence sur le marché de la thérapie cellulaire de tests à la fois fiables, rapides et peu coûteux pour l'évaluation du potentiel tumorigène d'échantillons cellulaires –, *Scancell* offre trois méthodes analytiques nouvelles pour la détection des cellules tumorales *in vitro*. Ces tests sont regroupés dans un même package que nous avons appelé Telocell. Nous présentons ici les grandes lignes de l'offre que nous développerons ; des informations complémentaires sur les concepts et données utilisés dans cette section sont disponibles en annexe [> Annexes scientifiques].

2.3.1 Concept d'immortalité répllicative

Les trois tests du package Telocell reposent sur un même principe : l'immortalité répllicative. Contrairement aux cellules tumorales, les cellules saines ne peuvent pas proliférer de manière indéfinie. La capacité de division de celles-ci est en effet limitée par un mécanisme irréversible, appelé sénescence répllicative, intrinsèquement lié à la biologie des télomères (Kuilman et al. 2010 ; Campisi 1997 ; Deng & Chang 2007).

Les télomères constituent les extrémités physiques des chromosomes. Il s'agit de segments d'ADN de taille variable, constitués par l'assemblage d'un bloc répétitif. Chaque télomère possède une structure en lasso (T-loop) et est lié à un complexe composé de six protéines appelé le complexe shelterin. Tant leur configuration particulière que le complexe qui les entoure permettent aux télomères d'assurer leur fonction principale : la protection des extrémités chromosomiques (Verdun & Karlseder 2007 ; Neidle & Parkinson 2003 ; Deng & Chang 2007).

Chaque fois qu'une cellule saine se divise, ses télomères se raccourcissent suite à l'action de la machinerie de réplication de l'ADN. Au fur et à mesure des divisions, ils deviennent de plus en plus courts, jusqu'à atteindre une longueur minimale critique, qui correspond à la perte de la T-loop et du complexe shelterin (Figure 2.3). La disparition de ces structures protectrices fait réagir la cellule, qui interprète cela comme la présence d'un dommage à l'ADN et déclenche donc le signal DDR (pour « *DNA damage response* »). Tels des pompiers, une série de protéines répondent à cette alarme sonnée par la cellule en créant une cascade d'interactions, qui a *in fine* pour effet d'activer deux effecteurs (les lances à incendie) : TP53 et PRB. En inhibant diverses étapes du cycle cellulaire, TP53 et PRB provoquent l'arrêt définitif de prolifération de la cellule qui ne peut alors plus se diviser ; elle est entrée en sénescence répllicative (Murnane 2012 ; Sulli et al. 2012 ; Campisi 1997 ; Ben-Porath & Weinberg 2005 ; Chuaire-Noack et al. 2010 ; Muñoz-Espín & Serrano 2014).

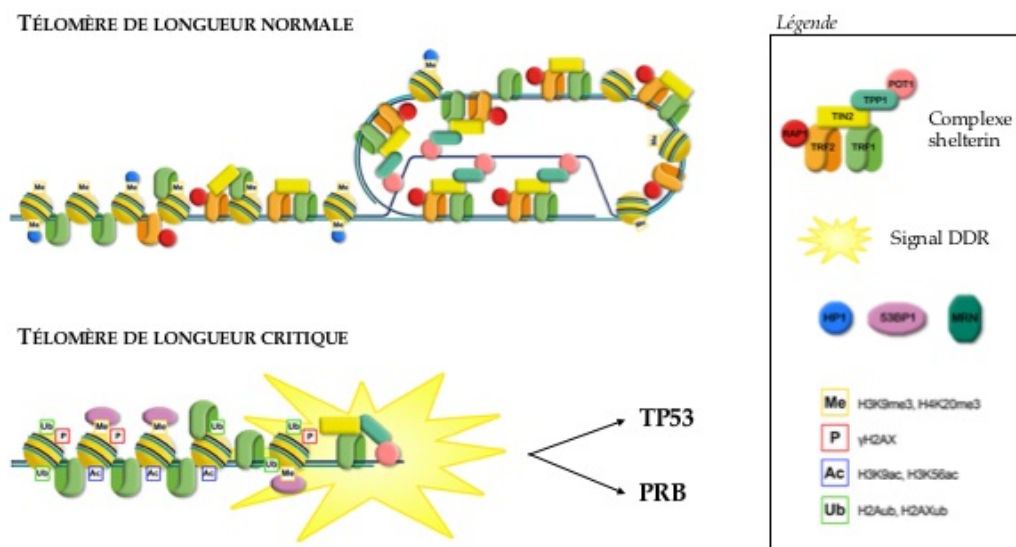


FIGURE 2.3 – Configurations d’un télomère de longueur normale et d’un télomère de longueur minimale critique, obtenue suite à son raccourcissement au fur et à mesure des divisions de la cellule (adapté de (Galati et al. 2013)).

Si les cellules tumorales sont capables de se diviser de manière indéfinie, c’est parce qu’elles échappent au mécanisme de sénescence répllicative. Ce phénomène est appelé immortalité répllicative. La capacité de division illimitée des cellules tumorales est due à l’utilisation par celles-ci de deux mécanismes d’allongement des télomères, qui agissent à chaque division pour rajouter la portion de télomère perdue. Ainsi, dans ces cellules, la longueur des télomères reste constante au fur et à mesure des divisions. La sénescence répllicative n’est donc jamais activée, puisque les télomères ne peuvent pas atteindre une longueur minimale critique. Dans ce cas, les protéines-pompiers n’agissent pas (et les lances à incendie – TP53 et PRB – ne sont jamais activées) car l’alarme (signal DDR) n’est pas sonnée (Cong et al. 2002).

Le mécanisme d’allongement des télomères utilisé par la majorité des types tumoraux (90%) est basé sur l’activité de la télomérase (hTERT, pour « *human telomerase reverse transcriptase* »). Il s’agit d’une enzyme spécialisée dans l’ajout de blocs répétitifs aux extrémités télomériques. Elle y synthétise de l’ADN (désoxyribonucléotides) en recopiant un ARN guide contenu en son sein (Figure 2.4 (a)) (Harley et al. 1994 ; Deng & Chang 2007 ; Cong et al. 2002).

Le second mécanisme d’allongement des extrémités télomériques, nommé ALT (pour « *alternative lengthening of telomeres* »), est utilisé par 10% des types tumoraux. Bien que les bases moléculaires d’un mécanisme indépendant de la télomérase soient pour l’instant incertaines, la majorité des études penchent pour un principe de recombinaison homologue entre deux télomères, un donneur et un receveur. Il a ainsi été postulé que l’extrémité du télomère receveur envahit une région similaire au sein du télomère

donneur et que l'allongement du télomère receveur se produit grâce à une synthèse d'ADN initiée sur base de la séquence du télomère donneur (Figure 2.4 (b)) (Henson et al. 2002 ; Verdun & Karlseder 2007).

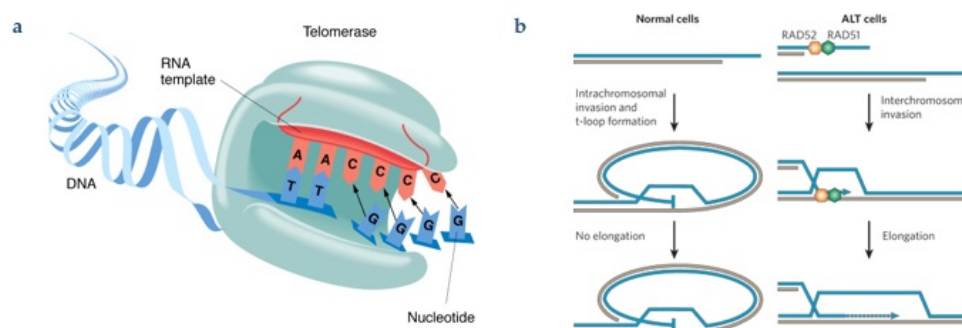


FIGURE 2.4 – Mécanismes d'allongement des télomères utilisés par les cellules tumorales. (a) Mécanisme basé sur l'activité de la télomérase hTERT (Park 2010), et (b) mécanisme ALT, modèle basé sur la recombinaison homologue entre deux télomères (Verdun & Karlseder 2007).

Dans le cadre de ce mémoire, l'immortalité répliquative a été sélectionnée parmi plusieurs marqueurs connus de tumorigénicité, et ce parce qu'il s'agit de l'unique caractéristique universelle des cellules tumorales : une cellule ne peut être tumorale sans être immortelle. En basant nos méthodes analytiques sur ce phénomène, nous garantissons donc l'entière fiabilité conceptuelle de Telocell, ce qui n'est le cas d'aucun autre test actuellement présent sur le marché.

2.3.2 Test limite *vs* test quantitatif

Une méthode analytique peut être définie comme une technique ou un ensemble de techniques permettant à son utilisateur de connaître qualitativement et/ou quantitativement la composition d'un échantillon. Selon les directives mises en vigueur par l'ICH (*International Conference for Harmonization*), l'industrie (bio)pharmaceutique est principalement concernée par trois catégories de méthodes analytiques (ICH Guidelines 2005 ; European Medicines Agency 2011) :

- les tests d'identification qui permettent de s'assurer de l'identité d'un analyte au sein d'un échantillon ;
- les méthodes de détection des impuretés ;
- les dosages qui ont pour but de fournir un résultat correct permettant de connaître la composition ou le potentiel d'action d'un analyte dans un échantillon.

Les méthodes développées dans le cadre d'une détection des cellules tumorales *in vitro* s'inscrivent dans la deuxième catégorie : la détection des impuretés (la cellule tumorale étant, en thérapie cellulaire, considérée comme une impureté). Ce genre de

tests peut être divisé en deux sous-catégories : le test limite et le test quantitatif. Alors que le test limite fournit une réponse binaire (positif/négatif) qui permet de déterminer si un échantillon contient ou non des cellules tumorales le test quantitatif, lui, a pour objectif de déterminer la quantité de cellules tumorales présentes dans l'échantillon.

Dans le cadre du projet *Scancell*, l'utilisation de tests limites a été sélectionnée pour deux raisons principales. Tout d'abord, parce que le développement de ce genre de méthodes analytiques est plus rapide et demande moins d'investissement financier. En effet, comme le Tableau 2.3 le montre, seuls deux paramètres doivent obligatoirement être définis lors du développement et de la validation d'un test limite : la spécificité et la limite de détection. La spécificité est la capacité du test à distinguer une cellule tumorale d'une cellule saine. La limite de détection (LOD) est la plus petite quantité de cellules tumorales (exprimée en pourcentage de cellules tumorales sur l'ensemble des cellules de l'échantillon) qui peut être détectée par la méthode analytique (ICH Guidelines 2005). Le test quantitatif, quant à lui, demande l'étude de paramètres supplémentaires. Ensuite, dans le cadre d'une application au secteur de la thérapie cellulaire, la quantification des cellules tumorales est inutile. A partir du moment où il a été identifié que des cellules tumorales sont présentes dans un échantillon, les acteurs de la thérapie cellulaire se soucient peu d'en connaître la quantité exacte, puisque le lot de « cellules-médicaments » ne pourra de toute manière pas être injecté. En thérapie cellulaire, aucun défaut ne peut être accepté.

Finalement, une distinction doit être faite entre le développement et la validation d'une méthode analytique. Le développement, antérieur à la validation, permet de vérifier le bien-fondé et d'optimiser une méthode analytique. La validation consiste ensuite à confirmer la fiabilité de la méthode sur base de critères d'acceptation définis lors du développement. C'est donc un processus incontournable pour créer un test de référence : un test non validé ne peut pas être commercialisé.

Tableau 2.3 – Paramètres analysés dans le cadre d’un développement et d’une validation d’une méthode analytique limite et d’une méthode analytique quantitative (ICH Guidelines 2005).

PARAMÈTRES	Type de test	
	LIMITE	QUANTITATIF
Exactitude	-	+
Spécificité	+	+
Limite de détection	+	-
Limite de quantification	-	+
Précision <i>intra-run</i>	-	+
<i>inter-run</i>	-	+
Intervalle	-	+
Linéarité	-	+

2.3.3 Tests

EXPERTISE « TÉLOMÉrase »

Le premier test du package Telocell consiste en une analyse du mécanisme utilisé par la plus grande partie des cellules tumorales, la télomérase, dans le but de mesurer l’expression du gène *hTERT*.

Un gène est une portion d’ADN (acide désoxyribonucléique) qui code une information héréditaire, permettant de procéder à la synthèse des protéines (les constituants majeurs, structurels ou fonctionnels de la cellule). Au sein de la cellule, quand un gène est exprimé, la section d’ADN qui y correspond est transformée en ARN messenger. Celui-ci quitte le noyau et transmet le message du gène aux ribosomes, les usines de la cellule chargées de transformer cette information en protéine. Le niveau d’expression d’un gène peut varier d’un type cellulaire à l’autre, au cours du temps ou suite à l’influence de différentes molécules effectrices. Plus l’expression d’un gène est élevée, plus la quantité d’ARN messenger produit par la cellule sera importante.

Ce premier test tire profit de ce principe et mesure l’expression du gène codant pour la télomérase en déterminant le nombre de copies d’ARN messenger possédant la séquence du gène *hTERT*. Ce test utilise une technique très particulière de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative : la RT-qPCR TaqMan en une réaction (Figure

2.5). Cette technique consiste en deux étapes successives (Life Technologies n.d. ; Cold Spring Harbor Laboratory (DNA Learning Center) n.d. ; Biorad n.d.) :

1. la transformation de l'ARN messager en ADN (ou transcription inverse, ou encore RT pour « *reverse transcription* ») ;
2. la réaction de qPCR TaqMan à proprement parler. Elle consiste à amplifier la séquence du gène *hTERT* et à déterminer le nombre de copies correspondant à ce gène. Lors de cette réaction, deux amorces (des morceaux d'ADN complémentaires à la séquence du gène cible) se fixent de part et d'autre de la séquence cible (à gauche l'amorce sens, et à droite l'amorce anti-sens). Une autre portion d'ADN se fixe également sur la séquence cible : la sonde, composée de l'association d'une molécule fluorescente (appelée rapporteur) et d'une molécule qui agit comme extincteur de fluorescence (appelé *quencher*). Au début de la réaction de qPCR, la sonde est entière, et le *quencher* éteint la fluorescence du rapporteur (par effet de proximité). Lorsque les amorces sont allongées par la polymérase (enzyme en charge de la réaction de qPCR), la sonde est détruite, ce qui libère le rapporteur qui n'est donc plus soumis à l'effet inhibiteur du *quencher* : de la fluorescence est émise. L'émission de fluorescence est proportionnelle au nombre de copies d'ARN présentes au départ dans l'échantillon, et donc au niveau d'expression du gène *hTERT*. Le résultat d'une qPCR est caractérisé par un indice, le Cp (pour « *crossing point* ») ; il correspond au nombre de cycles d'amplification à partir duquel la fluorescence s'élève au-delà du bruit de fond. Plus le Cp est faible, plus le nombre de copies d'ARN correspondant au gène *hTERT* est élevé.

Finalement, on parle de RT-qPCR TaqMan « en une réaction », parce que la transcription inverse et la qPCR ont lieu au sein d'un même tube de réaction. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'une polymérase capable de prendre en charge les deux étapes (dans notre cas, la polymérase Tth) (Roche Life Science 2015).

Afin de normaliser l'expression de *hTERT*, l'expression d'un gène de référence – le gène de la cyclophiline A ou *PPIA* – a également été analysée. L'analyse de l'expression de *hTERT* et de *PPIA* est réalisée dans le même tube de réaction de qPCR ; on parle alors de qPCR *multiplex*. Ceci est rendu possible grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes de couleurs différentes. L'utilisation du *multiplex* est indispensable dans le cadre de la commercialisation d'un test de diagnostic *in vitro*.

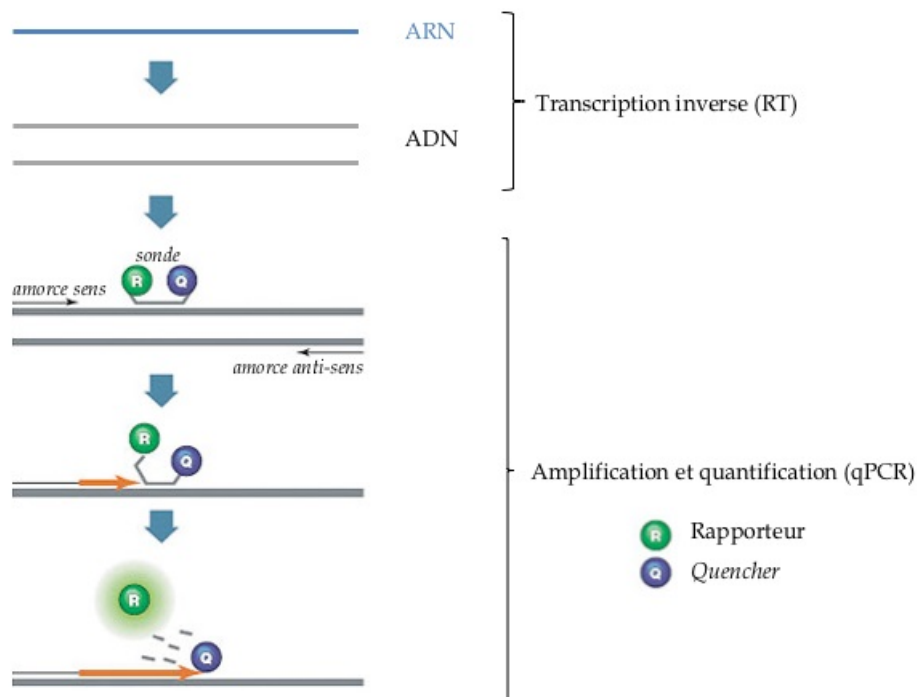


FIGURE 2.5 – Principe de la RT-qPCR TaqMan en une réaction (adapté à partir de (Biorad n.d.)).

Dans le cadre de ce mémoire, le test de mesure de l'expression du gène *hTERT* a été validé. Pour la validation de ce paramètre, deux types cellulaires ont été utilisés : des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BMMSCs) – en guise de cellules négatives, c'est-à-dire n'exprimant pas *hTERT* – et un type de cellules tumorales connu pour exprimer ce gène, les MG-63. Ce dernier type cellulaire a été obtenu à partir d'un ostéosarcome humain (Pautke et al. 2004). Il a ainsi été déterminé que ce test est :

- spécifique, car il fournit un résultat positif pour les cellules tumorales ($C_p = 29,13 \pm 0,02$), alors qu'aucun signal n'est détecté pour les BMMSCs.
- d'une sensibilité relativement bonne, puisque sa limite de détection est de 1%.

Tableau 2.4 – Résultats de la validation du test limite « Mesure de l'expression du gène *hTERT* ». ND : non détecté

PARAMÈTRE	RÉSULTAT
Spécificité	BMMSCs : ND MG-63 : $C_p = 29,13 \pm 0,02$
Sensibilité	1% MG-63

Dans le cadre de la collaboration scientifique entre Charlotte Bertrand et *Celyad*, un test supplémentaire d'analyse de la télomérase a été développé : il vise à mesurer l'activité de l'enzyme hTERT. Cependant, nous avons décidé de ne pas inclure ce test

dans le pack Telocell pour trois raisons principales. Tout d'abord, parce que l'utilisation de ce test en supplément du test « Mesure de l'expression du gène *hTERT* » est redondante et n'augmente pas la fiabilité de Telocell. Ensuite, parce qu'il représente le test le plus coûteux du package. Le supprimer nous permettrait donc de diminuer substantiellement le prix de Telocell. Et finalement, parce qu'il se base sur un kit tout prêt fourni par une autre entreprise et qu'il est donc peu innovant.

EXPERTISE « ALT »

Afin de couvrir tous les mécanismes connus d'allongement des télomères, deux tests relatifs au mécanisme ALT sont également contenus dans le package Telocell. Le premier s'intéresse aux caractéristiques génotypiques des cellules tumorales utilisant le mécanisme ALT (que nous appellerons cellules ALT-positives), et le second concerne un trait phénotypique de ces cellules.

- *Détection des mutations ALT*

Le génotype est l'ensemble des caractéristiques génétiques d'une cellule et détermine les caractéristiques observables de celle-ci (ces traits observables constituent le phénotype). Dans de nombreuses études, il a été démontré que les cellules tumorales utilisant le mécanisme ALT ont un génotype particulier, distinct des cellules tumorales qui ne l'utilisent pas. En effet, certains gènes sont spécifiquement mutés dans les cellules ALT-positives. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné les quatre gènes les plus fréquemment mutés dans les cellules ALT-positives (Tableau 2.5). Les mutations observées sur les gènes *TP53*, *IDH1* et *H3F3A* sont dites ponctuelles (un nucléotide est remplacé par un autre sur la séquence d'ADN) et celles observées pour *ATRX* sont des délétions (une portion d'ADN est supprimée).

Tableau 2.5 – Gènes et mutations sélectionnés pour le test « Détection des mutations ALT » (IARC TP53 Databas ; Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013 ; Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruher et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Maze et al. 2012 ; Kondo et al. 2014). ND : non déterminé

GÈNE	MUTATIONS	PRÉVALENCE MOYENNE DANS LES CELLULES ALT+
TP53	R175H	27,5%
	R248W	
	R248Q	
	R273H	
	R273C	
IDH1	R132H	79%
H3F3A	K27M	ND
	G34R	
	G34V	
ATRX	Délétions (ADD, ATPase/hélicase)	90,6%

Le test développé pour le package Telocell se base sur la technique d'ASB-qPCR (pour « *allele-specific binding* qPCR ») et permet de détecter rapidement les mutations ponctuelles (Morlan et al. 2009). Cette méthode est donc intéressante pour la détection des mutations sur *TP53*, *IDH1* et *H3F3A* mais ne peut pas être appliquée au gène *ATRX*. La technique d'ASB-qPCR est une variante de qPCR au cours de laquelle la séquence mutée sera préférentiellement amplifiée (Figure 2.6). Dans cette technique, deux types d'amorces sens sont utilisées :

- une amorce contenant la séquence d'ADN non-mutée, bloquée à son extrémité par un groupement phosphate (PO_4). Ce groupement a pour effet d'empêcher l'amplification de la séquence non-mutée ;
- une amorce contenant la séquence d'ADN mutée, permettant donc l'amplification de celle-ci. Grâce à la réaction classique de qPCR qui a alors lieu, le nombre de copies d'ADN muté peut être déterminé via le calcul du C_p .

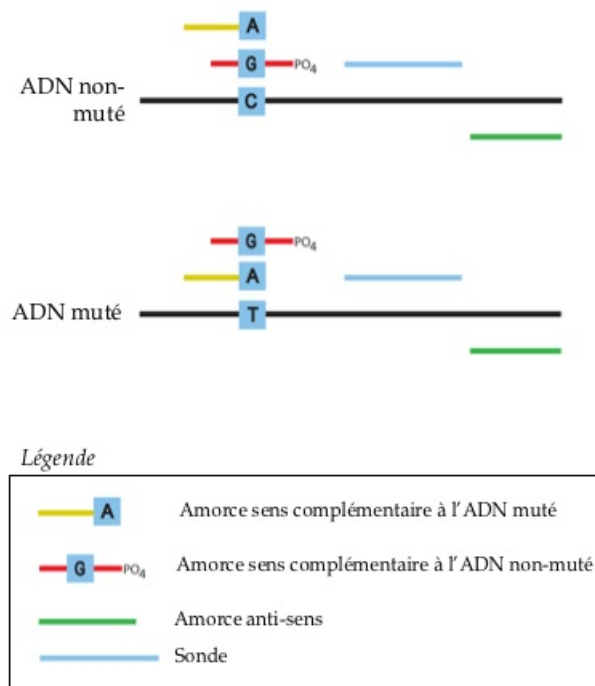


FIGURE 2.6 – Principe de l'ASB-qPCR (adapté à partir de (Morlan et al. 2009)).

Jusqu'ici, seules les mutations R273H et R273C du gène *TP53* ont été analysées par cette technique. Cette première phase de développement a ainsi permis de (1) tester plusieurs jeux d'amorces sens et (2) de déterminer la spécificité et la sensibilité (en pourcentage de copies mutées) de la méthode en utilisant le jeu d'amorces fournissant les meilleurs résultats (Tableau 2.6). D'autres développements seront nécessaires pour finaliser ce test. Ceux-ci seront détaillés dans le quatrième chapitre [> 4.3 Recherche et développement].

Tableau 2.6 – Gènes et mutations sélectionnés pour le test « Détection des mutations ALT » (IARC TP53 Databas ; Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013 ; Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Maze et al. 2012 ; Kondo et al. 2014). ND : non détecté

PARAMÈTRE	TP53 R273H	TP53 R273C
Spécificité	• Plasmide non-muté : ND	• Plasmide non-muté : $C_p = 32,75 \pm 0,10$
	• Plasmide muté : $C_p = 27,39 \pm 0,16$	• Plasmide muté : $C_p = 25,10 \pm 0,11$
Sensibilité	1% de copies mutées	$< 10\%$ de copies mutées

- *Mesure de la longueur des télomères*

Le second test de détection des cellules ALT-positives s'intéresse à un trait phénotypique de ces cellules. En effet, les cellules utilisant ce mécanisme sont caractérisées par une hétérogénéité de leurs télomères, c'est-à-dire que leur noyau contient à la fois des télomères très longs et très courts. Suite à la présence de télomères de longueur excessive, la longueur moyenne de télomères est plus élevée dans les cellules ALT-positives (Buczkowicz et al. 2014). C'est sur ce principe que le test de mesure de longueur des télomères repose.

Pour développer ce test, nous utilisons une technique de qPCR développée par Richard Cawthon (2009). Celle-ci permet de mesurer la longueur moyenne relative des télomères au sein d'un échantillon. Comme nous l'avons précédemment mentionné, les télomères humains sont constitués de blocs répétitifs. Plus le télomère contient de blocs répétitifs, plus il est long. Lors de la réaction de qPCR, les amorces vont se fixer sur ces blocs ; le signal fluorescent émis suite à l'amplification de cette séquence est proportionnel à la quantité de blocs répétitifs et donc à la longueur des télomères. Afin de normaliser la quantité de blocs télomériques, le gène mono-copie de l'albumine est également amplifié. Un rapport – appelé ratio T/S – est alors calculé en divisant le Cp obtenu pour l'amplification des blocs télomériques par le Cp obtenu pour l'amplification du gène de l'albumine, et représente la longueur moyenne relative des télomères d'un échantillon cellulaire (Cawthon 2009).

Contrairement aux autres tests utilisant la qPCR *multiplex*, le test de mesure de la longueur des télomères n'utilise qu'un seul type de fluorescence (autrement dit, une couleur). Pour ce faire, la sonde est remplacée par le SYBR Green I (Figure 2.7). Lorsque les amorces sont allongées, cet agent fluorescent s'intercale entre les brins d'ADN qui sont alors formés ; il émet alors de la fluorescence. L'émission de fluorescence par le SYBR Green est proportionnelle à l'amplification de la séquence-cible (Cawthon 2009 ; Sigma-Aldrich n.d.).



FIGURE 2.7 – Principe de la qPCR *multiplex* monochrome utilisant le SYBR Green I (Sigma-Aldrich n.d.).

Dans le cadre du stage de Charlotte Bertrand chez *Celyad*, l'objectif initial était d'utiliser ce test pour observer l'évolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des divisions de la cellule. Si le ratio T/S s'avérait constant, cela signifierait que l'échantillon est potentiellement tumoral. Cette application s'est révélée non-concluante, mais a tout de même permis d'analyser la spécificité de la mesure de la longueur des télomères par qPCR (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 – Résultats de l'analyse de spécificité du test « Mesure de la longueur des télomères » en *singleplex*, après optimisation. ND : non détecté

AMPLIFICATION	ECHANTILLON	C _P	SD
Télomères	ADN extrait	17,69	0,08
	ADN génomique pur	17,51	0,06
	H ₂ O	25,59	0,11
Albumine	ADN extrait	22,02	0,03
	ADN génomique pur	21,64	0,72
	H ₂ O	ND	ND

Après avoir abandonné la première application de ce test, nous nous sommes donc tournés vers la possibilité de l'utiliser pour identifier les cellules tumorales ALT-positives en nous basant sur le principe que celles-ci ont une longueur moyenne des télomères plus élevée que la normale. Plusieurs expériences supplémentaires sont nécessaires pour développer cette application. De plus, lors des expériences destinées à la première application du test, la méthode de qPCR elle-même a révélé quelques dysfonctionnements, qui devront être résolus pour que le test puisse être commercialisé. Tous les développements nécessaires à ce test seront décrits dans le quatrième chapitre [*> 4.3 Recherche et développement*].

En conclusion, le package Telocell contient trois tests basés sur la théorie de l'immortalité répliquative, et plus précisément des mécanismes d'allongement des télomères. Alors que le test destiné à mesurer l'expression du gène *hTERT* est validé et donc prêt à être commercialisé, les tests de détection des mutations ALT et de mesure de la longueur des télomères sont encore en développement (Tableau 2.8). L'offre actuelle est donc incomplète et une période charnière de finalisation sera intégrée à notre plan d'affaires pour y pallier. Mentionnons tout de même que cette période sera plus courte que le laps de temps accordé aux premières expériences, puisque la majeure partie des protocoles a déjà été mise au point. Alors que seules la spécificité et la sensibilité doivent être analysés dans le cadre de la création d'un test limite, des paramètres supplémentaires ont été développés et/ou validés pour deux des tests du package (Tableau 2.8). Ceci

nous permet d'envisager l'adaptation de Telocell en package quantitatif, même si notre priorité reste la mise sur le marché d'un package de tests limites.

Tableau 2.8 – Etat actuel des avancées en matière de développement et de validation de Telocell. Les paramètres analysés sont représentés par un +, les paramètres encore à analyser sont représentés par un -.

		EXPRESSION <i>hTERT</i>	MUTATION ALT				LONGUEUR TÉLOMÈRES
			TP53	IDH1	H3F3A	ATRX	
Développement	<i>Exactitude</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Spécificité</i>	+	+	-	-	-	+/-
	<i>LOD</i>	+	+	-	-	-	-
	<i>LOQ</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Précision</i>	+	+	-	-	-	-
	<i>Intervalle</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>Linéarité</i>	+	+	-	-	-	-
Validation	<i>Exactitude</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Spécificité</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>LOD</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>LOQ</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Précision</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>Intervalle</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>Linéarité</i>	+	-	-	-	-	-

2.3.4 Avantages compétitifs

Le package Telocell répond parfaitement à la demande de la thérapie cellulaire pour l'évaluation de la tumorigénicité de leurs échantillons de « cellules-médicaments », tant sur le plan scientifique que commercial. En comparaison avec les méthodes actuelles qui sont soit fiables mais chères et/ou longues soit non fiables mais bon marchés et/ou rapides, il présente le meilleur rapport fiabilité/attractivité commerciale.

Tout d'abord, Telocell est plus fiable que l'entièreté des techniques actuellement proposées aux acteurs de la thérapie cellulaire. Ceci, en raison de plusieurs aspects :

- Tous les tests du package se basent sur un mécanisme universel des cellules tumorales : l'immortalité répliquative. Comme nous l'avons déjà mentionné, 100% des types tumoraux existants possèdent cette caractéristique, indissociable de la tumorigénicité ;
- Les tests du package sont hautement complémentaires. Ils ne sont pas choisis au hasard, puisqu'ils permettent de couvrir tous les mécanismes connus d'allongement des télomères. Ils garantissent donc une analyse conceptuelle complète de l'immortalité répliquative ;
- Les tests pour lesquels la sensibilité a déjà pu être déterminée ont une limite de détection inférieure à la plupart des tests existants (1% ; 5,5%) ;
- Les résultats obtenus pour chaque test sont adaptés à chaque type de thérapie cellulaire. En effet, nous avons décidé d'ajouter une particularité au fonctionnement de nos tests en permettant au client d'en personnaliser le contrôle positif. Dans le cadre de nos expériences, un contrôle positif est un échantillon contenant uniquement des cellules tumorales et qui fournit un résultat positif fixe. Il permet donc de vérifier que le test s'est correctement déroulé. Lors du développement et de la validation d'un test, un échantillon de cellules tumorales est également utilisé pour déterminer la spécificité et/ou la sensibilité du test. Les MG-63, cellules d'ostéosarcome utilisées pour la validation du test « Mesure de l'expression du gène *hTERT* », n'en sont qu'un exemple. Il existe un grand nombre de lignées tumorales, qui se différencient par le type de tumeurs dont elles sont issues. Le but est ici de développer et valider chaque test du package Telocell en utilisant un panel de types tumoraux et de permettre aux acteurs de la thérapie cellulaire de choisir le type tumoral en tant que référence du test. Chaque thérapie a en effet ses spécificités, tant au niveau du matériel cellulaire initial (prélevé) que de l'organe ou de la maladie qu'elle peut traiter. Ainsi, des acteurs développant des thérapies cellulaires différentes s'intéresseront à des types tumoraux différents. Grâce à la personnalisation du contrôle positif, nous permettons à nos clients de disposer de résultats cohérents et adaptés à leurs besoins propres.

Une analyse statistique a permis de quantifier la fiabilité de Telocell. En sous-estimant la sensibilité des tests pour lesquels elle n'est pas encore connue, il a été déterminé que Telocell peut détecter près de 98,5% des cellules tumorales d'un échantillon. Ceci représente une avancée majeure pour l'évaluation fiable de la tumorigénicité *in vitro*.

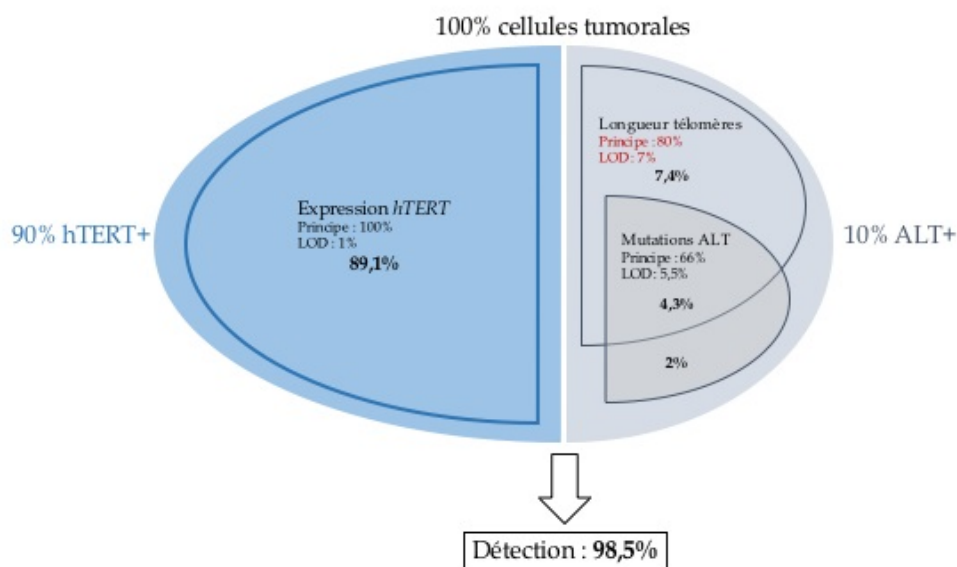


FIGURE 2.8 – Fiabilité statistique de Telocell.

Ensuite, Telocell est proposé à un prix compétitif au vu de sa grande fiabilité. Dans un premier temps, il sera proposé sous la forme d'un service comprenant le transport des échantillons, la réalisation des tests dans nos laboratoires et l'interprétation des résultats ; l'ensemble du processus facturé 900 € par échantillon cellulaire, comme expliqué dans la cinquième partie [*> 5.1 Evolution des revenus*]. Ce prix est près de deux fois plus faible que les autres tests disponibles sous la forme d'un service. Lors d'une seconde phase stratégique, Telocell sera vendu sous la forme d'un kit coûtant 1 000 € par échantillon. Notons que cette somme, plus élevée que pour le test de soft agar, est compensée par une fiabilité indiscutablement meilleure ou par une sensibilité supérieure. Si nous parvenons à proposer notre package à un prix compétitif, c'est grâce à une stratégie de réduction des coûts. En effet, tous les tests de Telocell se basent sur la méthode existante la plus commercialement attractive : la qPCR. Les réactifs (appelés consommables), le matériel et les équipements nécessaires pour cette technique sont peu coûteux, ce qui nous permet de proposer l'ensemble de nos tests à un prix abordable.

Finalement, parce qu'ils sont basés sur la qPCR, nos tests sont rapides. Lorsque Telocell est proposé sous la forme d'un service, nous fournissons les résultats à nos clients en une semaine, ce qui correspond à un gain d'une à trois semaines par rapport aux autres méthodes disponibles sous la forme d'un service. Une fois commercialisés sous la forme d'un kit, nos tests seront encore plus rapides (un jour), puisque le client les réalisera lui-même au sein de son laboratoire. Nous serons donc plus rapides que le test de soft agar.

2.3.5 Création de valeur

L'offre de *Scancell* consiste en une double création de valeur.

Tout d'abord, nous créons de la valeur pour les différents acteurs de la thérapie cellulaire, principalement pour ceux qui souhaitent évaluer la sécurité de leurs échantillons avant de les injecter chez l'humain : les hôpitaux, les entreprises et les C(D)MO. Grâce à Telocell, nous répondons à leur besoin précédemment formulé de disposer de méthodes alternatives pour l'évaluation du potentiel tumorigène de leurs échantillons. Nous offrons, à prix compétitif, des tests plus rapides et de plus haute qualité scientifique (en termes de fiabilité, de sensibilité et de cohérence) que ce que le marché propose actuellement. De plus, grâce à la complémentarité des trois tests, le résultat fourni quant à la détection des cellules tumorales est plus complet que les méthodes existantes.

Bien que *Scancell* ne vise pas directement les patients de la thérapie cellulaire, elle crée indirectement de la valeur pour eux. En effet, en fournissant des tests de qualité supérieure aux hôpitaux et aux entreprises, nous réduisons les risques que des cellules tumorales soient injectées aux patients et leur garantissons donc une plus grande sécurité de leur traitement.

2.4 Macro-environnement

Afin de déterminer l'influence que pourraient avoir sur notre projet différents facteurs macro-environnementaux, nous avons mené une analyse PESTEL. Celle-ci reprend la description de six catégories (politique, économie, social, technologie, écologie, législation) d'influence adaptées à notre secteur, puis définit une série de variables pivots qui sont les facteurs qui seront les plus influents sur notre marché (Johnson 2014).

Scancell s'inscrit dans le secteur des biotechnologies, en tant que jeune start-up amenée à se créer en 2016 en Wallonie. Lors de nos recherches et des différentes rencontres avec les parties prenantes du secteur des biotechnologies en général, nous avons pu nous apercevoir que le climat général de l'entrepreneuriat dans le monde des biotechnologies en Belgique était actuellement très propice à un développement innovant. L'industrie pharmaceutique de manière générale se porte même très bien, puisqu'elle garde un rythme de croissance annuelle de la production de 9% en moyenne depuis 2005 (Figure 2.9) (Essencia 2014).

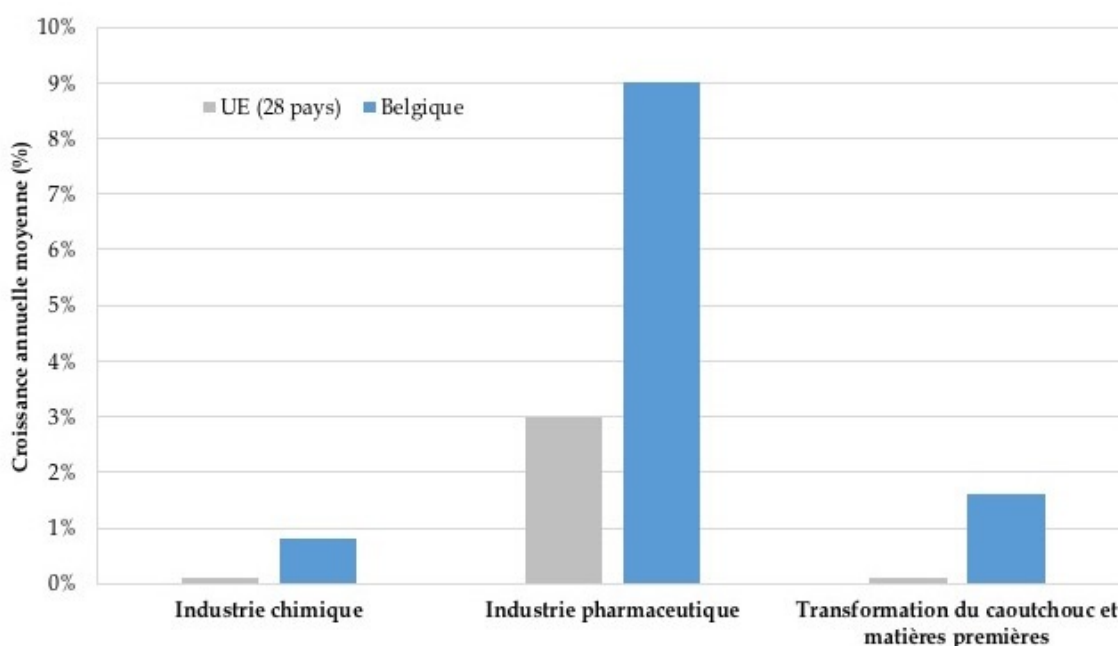


FIGURE 2.9 – Croissance annuelle moyenne de la production industrielle du secteur pharmaceutique. Comparaison entre l'Union Européenne et la Belgique entre 2005 et 2014 (Essencia 2014).

Différents facteurs, résumés dans la figure ci-dessous, peuvent expliquer ces conditions favorables.

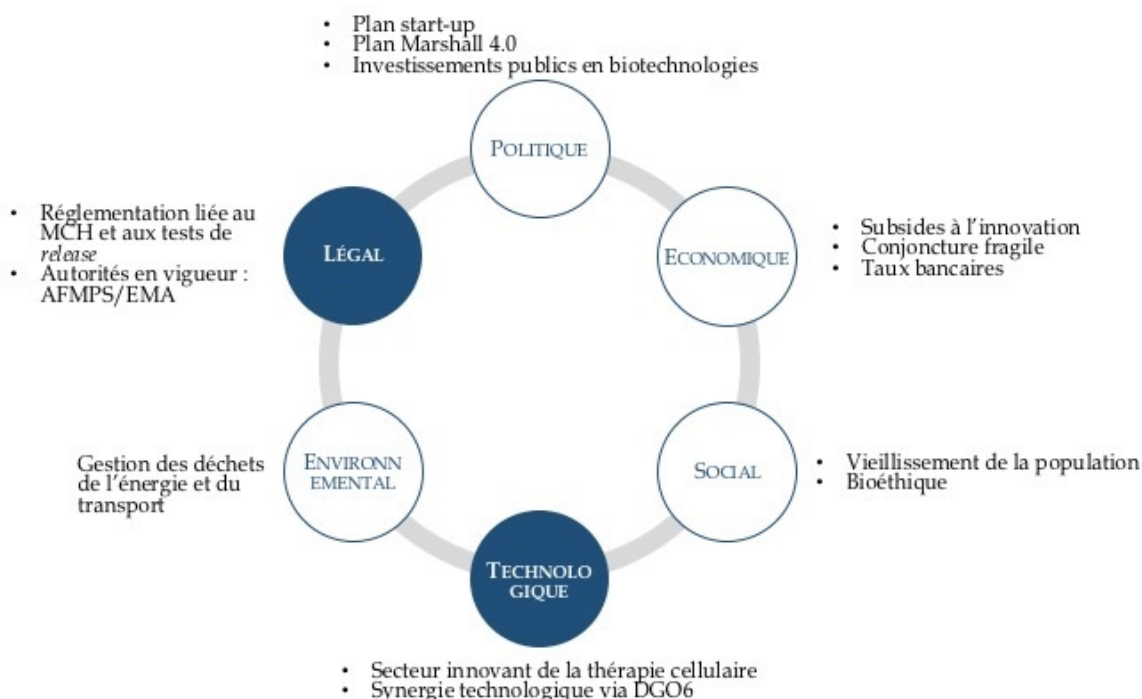


FIGURE 2.10 – Analyse PESTEL du macro-environnement.

2.4.1 Environnement politique

Sur la scène politique, nous pouvons aisément constater qu'en Belgique, et particulièrement en Wallonie, il existe une réelle volonté de relance économique, passant notamment par un encouragement à l'innovation entrepreneuriale. Participer au renouveau économique se fait entre autres par la DGO6 en Wallonie ou encore l'Agence de Stimulation Economique (ASE), deux organismes mettant en place des missions de soutien et d'aide aux entreprises wallonnes nouvellement créées ou en croissance.

D'une manière générale, plusieurs facteurs facilitent la vie des entreprises du paysage biotechnologique wallon dans son ensemble. Il serait tentant de penser que cette volonté libérale n'est due qu'à la composition de notre gouvernement fédéral actuel. Cependant, le système consensuel belge dans sa pratique permet de donner la parole aux différents partis, élus ou pas, et donc, d'assurer une forme de vision à long terme sur le plan économique. Plusieurs des facteurs politiques que nous allons maintenant développer vont dans ce sens et prévoient des actions pour des durées supérieures à un mandat électoral.

- *Plan start-up et diminution des charges patronales*

Composé de quatre mesures principales, le Plan Start-up (Digital Belgium 2015), élaboré par le gouvernement fédéral et entré en application en juillet 2015, offre plusieurs avantages pour les investisseurs et entrepreneurs dans le cadre d'entreprises récemment créées.

Parmi ces avantages, nous pouvons citer la diminution des coûts salariaux pour les jeunes entrepreneurs, via la dispense du versement d'une partie du précompte professionnel, ou encore des avantages fiscaux pour les investissements effectués dans les start-ups (de type « *tax shelter* »). Au niveau national, il existe une volonté de relance économique qui s'illustre notamment par un plan de réduction des charges patronales. Étale sur plusieurs années, ce plan ayant 2019 en point de mire, verra ces charges passer de près de 35% aujourd'hui à seulement 22% en fin de compte.

- *Plan Marshall 4.0 et Small Business Act*

Le Plan Marshall 4.0, adopté en mai 2015 par le Gouvernement wallon, se concentre sur certaines mesures jugées indispensables pour le redéploiement économique, permettant en fin de compte de structurer une politique industrielle durable. Près de trois milliards d'euros seront ainsi consacrés à ce plan composé de cinq axes principaux qui soutiennent certains points-clefs du développement économique tels que le capital humain, l'innovation, ou encore la transition énergétique. Une partie de ces fonds servira aussi au financement d'entreprises afin de soutenir des projets d'investissement. L'Agence pour l'Entreprise et l'Innovation (AEI) est un acteur majeur de ce plan Marshall 4.0 et offre des services d'appui et d'accompagnement aux jeunes entrepreneurs.

Au niveau régional toujours, le *Small Business Act* wallon est un plan d'action pour la période 2015-2019, qui, en reconnaissant le rôle majeur des PME dans le développement économique, fait de la simplification administrative un de ses fers de lance. D'ici 2019, les entreprises wallonnes auront en effet la possibilité d'obtenir très facilement l'information sur les services et aides qui leur sont disponibles, ce qui n'était pas le cas avant. De larges financements ont également été débloqués afin de développer des dispositifs de parrainage et d'incubateurs pour les jeunes entrepreneurs.

- *Importants investissements publics dans les biotechnologies*

La structure des différents organismes de soutien économique, particulièrement dans le secteur des biotechnologies wallonnes, leur laisse une marge de manœuvre au niveau des moyens débloqués pour l'investissement dans des projets prometteurs. La Wallonie

croit dans le potentiel de ses entreprises innovantes et le montre ostensiblement. Le pôle de compétitivité santé de Wallonie, *Biowin*, en est un bon exemple. Créée en 2006, cette plateforme est l'acteur de référence pour les différentes parties prenantes des secteurs de biotechnologies, de la santé et des technologies médicales.

Une autre illustration de cette velléité régionale de soutien financier est l'importante part d'investissement réalisée dans le secteur des biotechnologies : plus de 20% des investissements réalisés jusqu'à présent sont publics, soit 78 millions d'euros pour 329 millions d'euros d'investissement privés (Biowin 2015).

2.4.2 Environnement économique

Le macro-environnement économique dans le cadre de la création d'une entreprise de biotechnologie en Wallonie aujourd'hui est globalement positif, avec une légère réserve toutefois au sujet de la tendance générale macroéconomique.

- *Subsides à l'innovation*

Afin de soutenir la création d'activités économiques sur son territoire, la Région wallonne a également mis en place un système de bourses de préactivité (de 12 500€ en 2016) accordées pour des entreprises qui souhaitent innover, notamment en leur permettant de réaliser des études de faisabilité. Au niveau national, il existe également certains avantages et incitants fiscaux en recherche et développement. Par exemple, les revenus issus de brevets bénéficient d'une déduction fiscale rendant le terrain belge encore plus attirant pour les entreprises innovantes.

A l'échelle européenne, le programme « Horizon 2020 » est l'équivalent de nos programmes nationaux pour la recherche et l'innovation ; il débloque environ 80 milliards de subsides entre 2014 et 2020, pour tous les secteurs d'activité (EC 2015).

- *Conjoncture fragile*

La conjoncture économique, de manière générale, est importante pour la santé des entreprises biotechnologiques. Certes, les petites entreprises sont souvent moins touchées directement, néanmoins, le financement à moyen terme pourrait être affaibli par certains indicateurs boursiers. La thérapie cellulaire demande en effet de larges investissements en recherche et développement pendant plusieurs années avant d'espérer commercialiser ses produits. L'introduction en bourse est donc une option fréquemment choisie par les entreprises de biotechnologies.

Le problème, c'est que les biotechnologies semblent bénéficier d'une sorte de « bulle » due à une survalorisation générale, qui s'est fortement dégonflée récemment. L'indice *biotechnology* du Nasdaq (NASDAQ : NBI) par exemple a perdu plus de 35% entre juin 2015 et mai 2016 (Zonebourse 2016). Le risque est donc que cette crainte récente des marchés boursiers n'entache ces financements à cause de la frilosité des investisseurs. Or, sans financement conséquent, l'avenir des entreprises biotechnologiques est fortement compromis !

Un second aspect de la conjoncture économique a trait au budget de l'Etat et aux coupes budgétaires de ce dernier concernant les remboursements des médicaments (Delestrait 2015). En effet, en Belgique, le budget des soins de santé était de 23,8 milliards en 2015 (SPF Economie 2016). Or, le remboursement d'un médicament est souvent une condition indispensable pour sa commercialisation à grande échelle, au vu des prix parfois prohibitifs de ce genre de traitement. Pour une entreprise, les choix de maximaliser l'innovation et de réduire les coûts sont difficilement conciliables (Itinera Institute 2012). A long terme, la diminution des remboursements, en Belgique par l'Institut national d'assurance maladie-invalidité (INAMI), pourrait donc avoir des répercussions directes sur le nombre de patients traités par la thérapie cellulaire, et donc sur notre volume de vente.

- *Emprunts et financement traditionnels*

Concernant les sources plus traditionnelles de financement, maintenant, il est à noter que depuis plusieurs années, les taux directeurs bancaires sont très bas, ce qui signifie qu'il est possible d'obtenir des prêts bancaires à des taux particulièrement intéressants. Le pendant négatif, est que ces crédits deviennent plus difficiles à obtenir, si l'on compare à la situation en début de siècle, par exemple.

2.4.3 Environnement social

- *Tendances sociétales*

Le vieillissement de la population en Europe est une réalité (Eurostat 2015) et une tendance à long terme qui a débuté il y a plusieurs décennies. L'augmentation de l'espérance de vie combinée à des taux de fécondité nettement décroissants permettent d'expliquer le renversement de la pyramide des âges au sein de l'Union européenne. En conséquence, les personnes âgées représenteront à l'avenir une part de plus en plus importante de la société. Il est estimé que les personnes de plus 65 ans représenteront en 2080 près de 29% de la population de l'UE-28, contre seulement 18% aujourd'hui. Autant de potentiels clients pour la thérapie cellulaire, qui en Belgique développera

dans les années à venir un large spectre de traitements contre les maladies les plus communes (comme *Celyad* avec l'insuffisance cardiaque), comme des maladies rares qui ne touchent qu'un faible nombre de patients aujourd'hui (*Bone Therapeutics* dans les traitements osseux très spécifiques par exemple).

- *Bioéthique*

La bioéthique désigne la clarification de questions éthiques apparaissant avec le développement technologique dans le secteur des soins de santé et de la vie humaine (Durand 2005). Un domaine qui a son importance lorsqu'on souhaite développer des produits de thérapie cellulaire, puisque la manipulation cellulaire sous-jacente à l'activité permet d'agir sur la nature et sur l'homme de manière ciblée (Parlement européen 1990). Plus généralement, une réflexion quant à la nécessité de mieux encadrer l'utilisation à des fins thérapeutiques de produits d'origine humaine ou animale s'est mise en place suite aux crises successives autour des plusieurs affaires, comme celles du sang contaminé, de l'hormone de croissance ou encore de l'encéphalopathie spongiforme bovine (Cohen-Haguenauer 1999).

La thérapie cellulaire a donné lieu à de nombreux débats il y a une quinzaine d'années lorsque les connaissances scientifiques de l'époque ont offert une perspective réaliste d'aboutissement de traitement, dépassant le cadre juridique en vigueur à l'époque (EC 2002). La recherche sur les cellules souches embryonnaires est, par exemple, aujourd'hui encore sujette à discussion, et les différents cadres réglementaires ne s'accordent pas d'un pays à l'autre, puisqu'ils touchent à l'épineuse question du droit à la vie (Eurostemcell 2015). L'exemple de la France est révélateur de cette polémique. En effet, alors que les premières lois françaises de bioéthique de 1994 ont complètement interdit les recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires, la réalisation de travaux montrant l'intérêt des cellules souches embryonnaires dans le traitement de certaines maladies a poussé le ministère de la santé à réexaminer la loi. Depuis 2004, à titre dérogatoire et exceptionnel, certains projets de recherche sont donc autorisés, à condition qu'ils soient « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs » et s'il n'existe pas de « méthode alternative d'efficacité comparable » (Etats généraux de la bioéthique n.d).

En Belgique, aucune thérapie cellulaire actuellement développée ne se base sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires, toutes les entreprises ayant privilégié le prélèvement de cellules souches chez l'adulte.

C'est donc un sujet potentiellement sensible, mais face au lequel nous faisons l'hypothèse que, sauf conviction idéologique ou religieuse forte, le potentiel de guérison rendu possible par la multiplication des développements dans ce domaine sera pri-

vilégié. C'est ce qu'évoquait un patient malade lors d'une discussion de la Commission européenne en 2002 : *« D'un côté, il semble logique qu'il doive y avoir un débat éthique sur la question mais de l'autre, je n'en vois pas la raison. [...] Moi-même, je souffre de sclérose en plaques, mais c'est pareil pour la maladie de Parkinson, la leucémie et les cancers, et la liste n'est pas exhaustive. Je pense que pour tous ces gens qui souffrent, ce débat éthique n'a pas vraiment de sens. Simplement, ils n'en voient pas l'utilité. Ce qu'il leur faut, c'est une solution et pour l'heure, cette solution, ce sont les cellules souches. »* (EC 2002).

La thérapie génique, elle aussi, fait l'objet de réglementations suite aux débats bioéthiques qu'elle a engendré. Ceux-ci ont principalement attiré aux risques biologiques liés à cette thérapie, sur deux aspects : la modification génétique de cellules vivantes – qui peut être incluse de manière stable dans l'hôte par mutagenèse insertionnelle – et l'utilisation de vecteurs dérivés d'organismes pathogènes. La législation liée à la thérapie génique est donc destinée à *« garantir efficacité, reproductibilité et qualité, mais aussi à délimiter une marge de manœuvre au sein de laquelle la sécurité est hautement vraisemblable »* (Cohen-Haguenauer 1999). Ainsi, cette approche réglementaire devrait contribuer à l'adhésion du public face à cette thérapie innovante qui a le potentiel de guérir un grand nombre de maladies sévères.

2.4.4 Environnement légal

Le secteur des soins de santé est, en Belgique, très réglementé pour garantir la sécurité de ses citoyens. Chez nous, l'Agence fédérale des médicaments et produits de santé (AFMPS) est l'autorité compétente pour tout ce qui concerne la qualité, l'efficacité et sécurité des médicaments et produits de santé. Elle se charge entre autres de suivre et contrôler le développement des essais cliniques, ou de délivrer les autorisations de mise sur le marché. Au niveau européen, c'est l'EMA qui délivre ces autorisations.

La thérapie cellulaire possède, elle, un niveau de réglementation encore plus stricte, puisqu'elle traite du matériel corporel humain (MCH), qui fait l'objet d'une loi propre (loi du 23 décembre 2009). Ce cadre peu flexible permet d'expliquer pourquoi les procédures d'approbation des procédés et pratiques prennent tant de temps dans le secteur des biotechnologies.

2.4.5 Environnement technologique

L'impact de l'environnement technologique est légèrement flou dans notre cas. Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie cellulaire est un secteur industriel très innovant. Les entreprises investissent beaucoup de temps et d'argent dans la recherche et le développement afin de créer les produits et les procédés les plus efficaces

possibles. En 2014 par exemple, l'industrie biopharmaceutique belge dans son entièreté consacrait environ 2,4 milliards d'euros en R&D, pour une progression de plus de 25% depuis 2008, soit une moyenne annuelle de 3,8% (Pharma 2015).

D'un côté, cela est évidemment très profitable, puisque chaque année qui passe augmente notre potentiel de vente, puisque le nombre de patients enrôlés pour des essais cliniques augmente lui aussi. Le désavantage, c'est que cette innovation croissante va forcément attirer de nouveaux entrants sur le marché, mais aussi une augmentation des technologies disponibles qui nous feraient concurrence. Si les recherches technologiques évoluaient trop vite par rapport à notre innovation, nous ne pourrions garder longtemps notre avantage de premier entrant, puisque le secteur n'est pas encore mûr à court terme en nombre de clients accessibles.

- *DGO6*

La région wallonne, dans le cadre de ses différents plans de relance économique développés plus haut, met aussi à disposition une institution, la Direction générale opérationnelle Economie, Emploi et Recherche (la DGO6), source de services et de financement. Dans son rapport d'activité 2014 (DGO6 2015), la DGO6 présente plusieurs pistes pour participer à l'aménagement et l'équipement de parcs d'activités économiques. En Wallonie, il existe pour l'instant deux pôles majeurs pour la thérapie cellulaire : l'Axis Parc de Mont-Saint-Guibert et le parc scientifique de Gosselies, qui voient se concentrer plusieurs entreprises majeures, et permettent une synergie technologique, facilitée par des partenariats soutenus par la DGO6.

2.4.6 Environnement écologique

Le respect de l'environnement est une préoccupation actuellement très en vogue dans le monde occidental. L'écologie en général s'inscrit dans une tendance de protection à la fois de notre environnement et de ses constituants et qui possède donc directement un lien avec l'avenir de l'être humain à court, moyen et long termes (Aubert et al. 1998).

L'impact écologique de *Scancell* se limitera principalement à la gestion de nos déchets, à la consommation en énergie et aux transports engendrés par notre activité. De par notre focus B2B, la quantification de cet impact revêtira un intérêt commercial moindre que dans une activité B2C par exemple. Le consommateur final est en effet conscientisé sur sa responsabilité écologique grâce à la forte médiatisation de problématiques environnementales (Deval 2015).

Nous sommes également conscients que le domaine des soins de santé puisse être exempté de satisfaire aux mêmes standards écologiques que la plupart des autres

entreprises. En effet, produire des traitements permettant d'améliorer le quotidien de l'être humain est un objectif pour lequel il semble accepté de mettre toutes les chances de son côté. Le manque de rigueur sur le respect de certaines conventions écologiques, n'est pas encore, nous le supposons, une raison de refuser un traitement améliorant notre qualité de vie de ou celle de l'un de nos proches.

2.4.7 Variables pivots

En guise de conclusion à cette analyse PESTEL, nous souhaitons mettre en évidence deux facteurs susceptibles d'affecter significativement le développement de notre entreprise, selon la définition faite par Johnson des variables pivots (Johnson 2014), et nous établirons deux scénarii possibles pour chacune d'elles.

- *Cadre réglementaire*

En 2009, *Tigenix*, une entreprise belge, recevait la première autorisation européenne pour la commercialisation d'un produit issu de la thérapie cellulaire. Quelques années plus tard, il n'y a pourtant toujours pas d'autres produits belges commercialisés sur le marché.

Cette constatation traduit une constante dans les biotechnologies : l'incertitude économique liée au cadre légal. Les entreprises de thérapie cellulaire qui souhaitent recevoir une autorisation de mise sur le marché sont soumises à des contraintes très strictes, et ne sont pas à l'abri d'une décision de l'Agence européenne des médicaments, ou de sa consœur américaine, la FDA, qui réduirait à néant des années de développement. Notre intervention dans ce processus est elle aussi soumise à un processus d'accréditation comme test de *release*.

Si ce cadre légal restait constant ou s'assouplissait (scénario 1), nos prévisions financières et de pénétration de marché se confirmeraient, et nous pourrions faire valoir nos résultats scientifiques par l'accréditation auprès de nos clients. Dans le cas contraire, où nous ne bénéficierions pas d'un soutien légal, et où le cadre en place se durcirait quant à l'autorisation de commercialisation d'un médicament (scénario 2), nous pâtirions économiquement de la situation, en mettant à mal nos hypothèses de développement, puisque ce dernier serait fortement retardé.

- *Evolution technologique*

Le secteur des biotechnologies reste très innovant au fil des années, et la croissance exponentielle de ce domaine d'activité devrait conforter le pôle belge qui est en train de se développer. De 2005 à 2013, la croissance du secteur santé des biotechnologies en Belgique a bénéficié d'une croissance de 10% par an sans interruption (Biotechnologies

2014). Il est fort à prévoir que, dans les prochaines années, les différentes commercialisations des produits de thérapie cellulaire donnent lieu à de nouvelles créations d'entreprises, combinées à un important recrutement. La création de 15 500 emplois directs sur cette même période 2005-2013 en Belgique (Biotechnologies 2014), laisse en effet présager une tendance similaire pour les années à venir.

Ce développement a des conséquences technologiques importantes, et les techniques de détection de cellules tumorales évoluent rapidement aussi.

Il se pourrait que cette innovation technologique se stabilise (scénario 1), nous laissant davantage de temps pour nous implanter sur le marché, et nous permettant de ne pas être submergés par des solutions concurrentielles. Une autre possibilité contraire est que l'évolution vers la haute technologie se fasse de plus en plus rapidement (scénario 2), et que le développement de méthodes concurrentes nous oblige à investir rapidement en R&D pour rester compétitifs.

Cette incertitude technologique reviendra dans notre travail lorsque nous aborderons les aspects financiers en tenant compte d'une diminution du prix de notre produit à moyen terme sous les pressions concurrentielles.

2.5 Micro-environnement

Après avoir analysé le marché et son macro-environnement, nous souhaitons maintenant passer en revue l'attractivité de l'industrie, grâce aux 5(+1) forces de Porter, qui hiérarchisent cinq facteurs du micro-environnement qui pourraient influencer notre liberté stratégique (Johnson 2014). Nous allons également examiner une sixième force, le rôle des pouvoirs publics, dont l'apport est parfois contesté idéologiquement, notamment par Porter lui-même, dans certains milieux prônant le non-interventionnisme de l'Etat (Harvard Business Review France 2014). Cette force est cependant non-négligeable pour nous par l'importance du cadre légal et des subventions au développement.

Une fois l'intensité de ces forces pondérée, nous identifierons certains facteurs clefs de succès, qui sont les éléments stratégiques qu'il nous conviendra de maîtriser afin d'obtenir et maintenir un avantage concurrentiel.

2.5.1 Intensité concurrentielle

Un marché à fort potentiel rime évidemment avec concurrence, bien que, nous allons le voir, le manque de maturité du marché implique que les acteurs qui y sont présents sont au final assez peu nombreux et généralement assez jeunes.

La concurrence directe, incarnée par les acteurs qui proposent des tests de détection *in vitro* des cellules tumorales basées sur la théorie des télomères, est de ce fait assez limitée dans un premier temps. D'autres entreprises développent pourtant des méthodes similaires, mais aucune ne les a spécifiquement conçues avec et pour la thérapie cellulaire. Cette expertise spécifique que nous mettons en place est, en ce sens, un avantage concurrentiel non-négligeable qui nous permettra de bénéficier d'un avantage de premier entrant pendant un certain temps, au vu des délais réclamés par les autorités sanitaires lorsqu'il s'agit de faire valider de nouveaux procédés. De plus, aucune entreprise ne propose encore d'évaluer la tumorigénicité *in vitro* en combinant les trois tests que nous proposons. Nous apportons donc une solution intégrée aux entreprises. Finalement, nous nous démarquons de ces acteurs en proposant au client de choisir le type de cellule tumorale utilisé comme contrôle du test, c'est-à-dire en personnalisant nos tests selon leurs besoins.

Notre principal concurrent direct se trouve en l'entreprise *Roche*, qui développe les kits de mesure de l'activité de la télomérase que nous avons utilisés pour nos recherches [> Annexes scientifiques]. *Roche* est un des *leaders* mondiaux de l'industrie pharmaceutique actif tant dans le secteur diagnostic que pharmaceutique (Roche 2015). Avec près de 120 ans d'expérience, *Roche* compte aujourd'hui près de 90 000 employés à travers le monde et a dépensé en 2014, dix milliards de dollars en recherche et développement,

soit environ 20% de son chiffre d'affaires (PWC 2015). De plus, il est fort probable que certaines entreprises spécialisées dans le développement de méthodes analytiques sur demande, appelées CRO (pour « *contract research organizations* »), proposent des tests ayant pour but de mesurer l'expression du gène *hTERT*. Cependant, étant donné le niveau de confidentialité engagé par ces entreprises, nous ne bénéficions pas des données nécessaires pour évaluer précisément l'impact de tels acteurs.

Nous avons repéré sept concurrents indirects, qui développent actuellement des méthodes alternatives de détection *in vitro* de cellules tumorales, les principales ayant été présentées au début de ce chapitre [> 2.3 Offre]. Les désavantages liés à ces méthodes alternatives nous permettent à l'heure actuelle de ne pas les considérer comme source de danger à court terme.

La liste des différentes entreprises concurrentes et/ou entrants potentiels en Belgique est reprise dans le tableau ci-dessous ; la description de leur technologie en développement se trouvant dans [> Annexe B Etude de marché].

Tableau 2.9 – Intensité de la menace concurrentielle. Echelle de 1 (étant le moins dangereux) à 5 (étant le plus dangereux).

CATÉGORIE	ENTREPRISE	INTENSITÉ DE LA MENACE
Concurrent direct	<i>Roche</i>	3
	<i>Belgian Volition</i>	1
	<i>MdxHealth</i>	1
	<i>Diagenode</i>	2
Concurrent indirect	<i>DNAvision</i>	2
	<i>Cell BioLabs</i> (Distributeur belge : Bio-Connect)	2
	<i>IPG</i> (Institute of Pathology and Genetics)	1
	<i>Biocartis</i>	2
	<i>DNAlytics</i>	2
	<i>ImmuneHealth</i>	4
	<i>AnaBioTec</i>	1
Entrant potentiel	<i>Biogazelle</i>	1
	<i>Diagenode</i>	1
	<i>Delphi genetics</i>	1
	<i>DNAvision</i>	1
	<i>Eurofins Scientific</i>	1
	<i>NXT-Dx</i>	1
	<i>Quality Assistance</i>	5
	<i>SGS Life Sciences</i>	4

2.5.2 Menace des produits de substitution

Les produits de substitution sont, dans notre cas, incarnés par l'ensemble des méthodes alternatives de détection *in vitro* des cellules tumorales. En thérapie cellulaire, quatre d'entre elles sont principalement utilisées : le caryotype, le test HGC, le soft agar et le séquençage. Comme nous l'avons mentionné dans la section - Couple produit-marché, d'autres méthodes existent mais sont non pertinentes dans le cadre de la thérapie cellulaire car trop spécifiques.

Très faible actuellement, cette menace pourrait évoluer dans le futur, car les solutions actuelles ne sont pas satisfaisantes du point de vue de leur efficacité. Aucune méthode légalement reconnue ne permet à l'heure actuelle de garantir l'absence de cellules tumorales dans les échantillons de cellules destinés aux patients. En rajoutant à cela le temps moyen des méthodes alternatives, et leur prix particulièrement élevé qui en découle, ces substituts ne représentent qu'une faible menace pour *Scancell*.

2.5.3 Menace des nouveaux entrants

Une partie importante du risque concurrentiel se situe par contre dans les potentiels entrants, notamment les grosses structures pharmaceutiques qui pourraient décider d'ajouter à leur portefeuille de produits une ligne spécifique de services destinés à la thérapie cellulaire, ou encore des entreprises étrangères appâtées par la « *cell therapy valley* » belge.

Les barrières à l'entrée sont relativement importantes, puisque les normes légales dans ce secteur sont assez contraignantes, de même que les investissements initiaux, qui sont fréquemment assez lourds. Cependant, une fois le processus maîtrisé, des économies d'échelle peuvent être importantes dans le cadre de larges productions. Cela défavorise particulièrement les petits acteurs, qui n'ont que peu d'espoir de se développer, à moins de bénéficier d'importants financements de la part de leurs investisseurs.

De la liste complète de ces entrants potentiels qui se trouve dans le Tableau 2.9, trois entreprises en particulier ont attiré notre attention (Tableau 2.10), par leur secteur d'activité, les liens qu'elles ont déjà pu tisser avec le secteur de la thérapie cellulaire et les importantes ressources dont elles disposent :

- Créée en 1982, *Quality Assistance* a su s'imposer comme un acteur important dans les secteurs industriels, en développant des méthodes analytiques. Lors d'un entretien téléphonique, ils se qualifiaient eux-mêmes d'observateurs du marché de la thérapie cellulaire mettant en place une expertise pour accompagner les entreprises sur les lieux de production. L'optimisation des procédés est en effet

- un élément clé du *business model* de cette *Contract Research Organization* (CRO).
- *SGS Life Sciences* est une entreprise globale de consultance dans tous les domaines industriels qui possède une longue expertise reconnue mondialement, particulièrement dans les biotechnologies, avec son département « *Life sciences* ». Ils se chargent notamment de tester et d’inspecter la qualité, la sécurité et les performances des produits développés par les entreprises de biotechnologie, toujours pour le compte d’un client tiers.
 - *Immunehealth* est également une CRO belge, qui développe des services intégrés de qualité pour les biomarqueurs et biomolécules des entreprises pharmaceutiques en général. Ils peuvent se targuer d’avoir comme clients quelques-uns des plus grands noms du secteur pharmaceutique et plus récemment, de la thérapie cellulaire.

Tableau 2.10 – Principaux entrants potentiels sur le marché de *Scancell*. Le tableau présente un résumé des informations-clefs des principaux entrants potentiels du projet en thérapie cellulaire, sur base des informations disponibles en ligne et de leurs comptes annuels.

	<i>Quality Assistance</i>	<i>SGS Life Sciences</i>	<i>Immunehealth</i>
Chiffre d’affaires	15,1 millions d’€ (2014)	5,25 milliards d’€ (2014)	1,4 millions d’€ (2013)
Personnel	140	80 000 dans le monde ; 1 600 en Belgique	40
Année de création	1982	1878	2007
Pays d’origine	Belgique	Suisse	Belgique

Par rapport à ces potentiels entrants en général, nous possédons évidemment l’avantage du premier arrivant (en ce qui concerne les tests que nous développons). De plus, grâce à nos démarches auprès des autorités et la future qualification de notre package en tant que tests de *release*, *Scancell* bénéficiera d’une réputation qui favorisera et accélérera sans nul doute la relation client.

2.5.4 Pouvoir de négociation des fournisseurs

Nos fournisseurs seront les entreprises chez qui nous achèterons nos matières premières (ou consommables), c’est-à-dire les éléments grâce auxquels nous effectuerons notre service d’analyse mais également nos recherches R&D.

Paradoxalement, en plus d'être un concurrent direct et un entrant potentiel, l'entreprise *Roche* est également un de nos fournisseurs. Celle-ci possèdera un pouvoir de négociation modéré à nos yeux, et ce pour plusieurs raisons. Bien que nos tests et procédés aient été développés avec leurs produits, créant une sorte de dépendance envers eux, ils ne sont pas les seuls sur le marché à proposer ces composantes dans la forme qu'on leur connaît ; donc trouver un fournisseur de substitution ne poserait pas de problème, malgré que cela nous contraindrait à des investissements supplémentaires en recherche et développement, ainsi qu'un délai dans le lancement du projet (lié à de nouvelles procédures de développement et de validation liées au changement de consommable). De plus, il faut savoir qu'usage des kits d'analyse vendus par *Roche* que nous utilisons dans le cadre de nos développements est restreint contractuellement à la R&D. Nous reviendrons plus tard sur les conséquences légales et financières de cet aspect, mais cela implique que *Roche* possèderait bel et bien un intérêt à ce que nous vendions nos produits. Une fois une autorisation d'exploitation négociée, nous posséderons une garantie nous permettant d'utiliser ces kits à notre guise.

Les autres fournisseurs, ceux qui commercialisent des consommables plus standards mais aussi les machines et installations nécessaires à notre établissement en tant que prestataire de service et plus tard, comme entreprise de production, sont aisément substituables, car aucun ne présente de caractéristique le rendant indispensable. Leur pouvoir de négociation est donc limité.

2.5.5 Pouvoir de négociation des clients

Le pouvoir de négociation des clients est, lui aussi, à nuancer. Il est dans un premier temps assez fort, car le petit nombre d'entreprises clientes dans le secteur nous obligera à les convaincre d'utiliser nos tests, une condition indispensable à notre survie économique. La difficulté réside dans le fait que chaque acteur du secteur a la possibilité, parmi une liste de méthodes acceptées par les autorités, de choisir le ou les test(s) qu'il juge le(s) plus adapté(s) à son produit. Pour rappel, c'est le caryotype qui est généralement utilisé dans la majorité des cas, et ce, faute de mieux. Il est donc de notre mission de persuader les hôpitaux et entreprises de thérapie cellulaire des plus grandes qualités scientifiques et commerciales de nos tests, afin que ceux-ci deviennent une référence dans le secteur. Dans cette optique, les données obtenues en laboratoire, suivies de l'accréditation par les autorités en tant que tests de *release* faciliteront grandement la démarche auprès des acteurs de la thérapie cellulaire. Cependant, une fois cette étape effectuée, le pouvoir de négociation des clients se restreindra, car ils bénéficieront alors de peu d'alternatives. En effet, comme expliqué précédemment, un changement de fournisseur (que nous incarnons ici) entraîne généralement des adaptations de procédure, longues et coûteuses, que ces entreprises essayent donc d'éviter à tout prix.

De plus, au vu de la jeunesse du secteur de manière générale, la marque possèdera peu d'impact sur les relations et les choix effectués par nos clients.

Un dernier risque pourrait provenir de l'intégration de notre business en aval, c'est-à-dire, que nos clients s'occupent du développement et commercialisation de leur produit de A à Z, sans se spécialiser dans une activité particulière. Cependant, au vu de la dimension actuelle des acteurs en Belgique, cette hypothèse n'est pas encore envisageable, tant les procédés de thérapie cellulaire possèdent de multiples facettes difficiles à maîtriser par une seule entreprise, à moins de posséder un financement extensif et une organisation colossale.

2.5.6 (+1) Pouvoir public

Le rôle des pouvoirs publics est important, et non-négligeable dans notre cas. Les autorités nationales et supranationales de réglementation médicamenteuse d'une part, ont en effet un pouvoir énorme sur notre reconnaissance auprès des entreprises du secteur, mais aussi sur le développement des produits de nos clients et donc directement sur notre volume de vente.

D'autre part, les pouvoirs publics, via plusieurs institutions évoquées précédemment, offrent financements et soutiens dont nous souhaitons bénéficier durant les premières étapes de notre développement. Un brusque arrêt de ces services nous serait fortement dommageable, même si cela semble peu probable à l'heure actuelle.

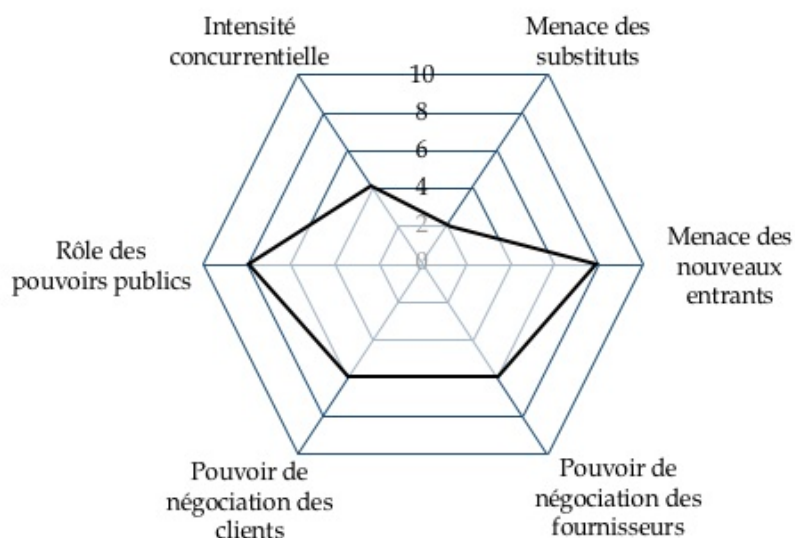


FIGURE 2.11 – Hexagone sectoriel illustrant l'attractivité du secteur des tests de *release* pour la thérapie cellulaire. Représente la pondération estimée des 5(+1) forces de Porter.

La Figure 2.11 présente l'illustration des 5+1 forces de Porter, sous la forme d'un hexagone sectoriel, représentant chaque force et son degré d'intensité, allant du plus faible au plus important, de 0 à 10. Logiquement, plus la surface couverte est importante, moins le secteur sera considéré comme attirant.

Une critique fréquemment formulée au sujet du modèle de Michael Porter, est qu'il présente une vision « offensive » de l'industrie, où les différentes entreprises sont systématiquement en compétition avec les autres parties prenantes. Dans la pratique, les collaborations sont possibles et fréquentes dans le domaine de la thérapie cellulaire. Nous ne ferons pas exception à la règle puisque plusieurs partenariats viendront compléter notre plan stratégique, notamment avec nos fournisseurs ou avec des laboratoires d'analyse qui sont de potentiels entrants. *Masthercell* par exemple ferait un formidable concurrent (par sa grande capacité organisationnelle à développer des méthodes analytiques appliquées à la thérapie cellulaire), mais aussi un partenaire exemplaire dans le cadre d'une collaboration. Heureusement, les procédés mis en place pour la thérapie cellulaire sont longs et coûteux et aucune entreprise en Belgique n'a pour l'instant les moyens ou les capacités d'internaliser l'entièreté de sa chaîne de production. Notre décision stratégique par rapport à ces acteurs sera développée au chapitre suivant.

En guise de conclusion à cette partie décrivant le microenvironnement, nous souhaitons finalement dégager plusieurs facteurs clés de succès, qui sont des variables permettant de contrecarrer les forces de Porter, et dont la maîtrise est nécessaire pour le succès de l'entreprise (Janssen 2009).

Pour le projet *Scancell*, nous en identifions trois principaux : la capacité à faire accréditer nos tests auprès des autorités compétentes, nous créant un avantage concurrentiel indiscutable ; la création de partenariats stratégiques avec d'autres entreprises du secteur afin de bénéficier de leur expertise et de leur réputation ; l'implantation et le développement rapide sur ce marché à forte croissance afin de devenir une référence incontournable dans le domaine tout en diminuant le risque de se faire avaler par la concurrence.

Stratégie

3.1	Mission et vision	80
3.2	Déploiement stratégique en trois phases	81
3.2.1	Contraintes environnementales et réglementaires liées à l'activité de <i>Scancell</i>	81
3.2.2	Construction de la stratégie en trois phases	85
3.3	Capacité stratégique	89
3.4	Diagnostic stratégique	96
3.4.1	Lien entre les chaînes de valeur de <i>Scancell</i> et de nos clients . .	96
3.4.2	Activités principales et de soutien	97
3.5	Choix stratégiques	100
3.5.1	Cibles	100
3.5.2	Positionnement concurrentiel	102
3.6	Evolution commerciale.	106
3.6.1	Positionnement sur le marché	106
3.6.2	Intégration opérationnelle	107
3.6.3	Expansion territoriale	108
3.6.4	Stratégie de diversification à moyen terme.	109
3.7	Analyse SWOT	112
3.7.1	Forces	112
3.7.2	Faiblesses	114
3.7.3	Menaces	115
3.7.4	Opportunités	118

3.1 Mission et vision

La mission de *Scancell* est de contribuer à la santé des patients de la thérapie cellulaire en apportant aux entreprises et hôpitaux de ce secteur une solution de détection fiable, rapide et peu coûteuse des cellules tumorales.

Cette mission pourra tout d'abord être assurée par le développement et la validation de nos trois tests de détection *in vitro* des cellules tumorales, dont l'usage par nos cibles permettra de diminuer la probabilité d'injecter des cellules tumorales à un patient. Pour assurer le respect de cette mission, *Scancell* s'informe également un maximum sur les différents risques tumorigènes liés aux produits de thérapie cellulaire afin de trouver des solutions innovantes à ces problématiques et adaptées à chaque produit. Dans ce sens, *Scancell* collabore étroitement avec les différents acteurs du secteur afin de cibler précisément les différentes problématiques de sécurité rencontrées par les clients. Pour rester à la pointe de la technologie et proposer toujours le produit qui corresponde le plus aux attentes des différents acteurs du marché, *Scancell* investit largement dans la recherche et le développement dans le but de perfectionner l'offre actuelle.

La vision de *Scancell* est de devenir le *leader* européen dans la détection *in vitro* des cellules tumorales.

Scancell a également pour ambition d'élargir sa gamme clients, en visant le secteur des sciences de la santé de manière générale. Notre déploiement à moyen et long terme s'accompagnera du développement de trois valeurs cardinales de notre entreprise : transparence, qualité et innovation. Le facteur humain sera également au centre de l'entreprise *Scancell*. En effet, l'espoir d'augmenter la sécurité des patients de la thérapie cellulaire et, par la suite, de permettre à d'autres entreprises de développer des traitements innovants sont autant de paramètres qui véhiculent un esprit d'entreprise valorisant sur le plan humain et éthique. Ces facteurs stimuleront la motivation de nos collaborateurs comme ils nous motivent aujourd'hui.

3.2 Déploiement stratégique en trois phases

La stratégie est une discipline à part entière caractérisée par trois enjeux cruciaux : la création de valeur, l'affrontement concurrentiel et le choix de périmètre d'activité. Cette discipline peut être définie de la manière suivante : « *Pour une entreprise, la stratégie consiste à choisir ses activités et allouer ses ressources de manière à atteindre un niveau de performance durablement supérieur à celui de ses concurrents dans ces activités, dans le but de créer de la valeur pour ses actionnaires* » (Lendrevie & Levy 2013). Plusieurs moyens et systèmes peuvent être utilisés afin de définir la stratégie d'une entreprise ; nous nous penchons ici, à travers une démarche empirique, sur une analyse de notre environnement direct et des contraintes qui y sont liées (Lendrevie & Levy 2013). La construction d'une stratégie pertinente dépend fortement de plusieurs facteurs comme la concurrence, les capacités mobilisables, l'environnement ou encore les clients (Lendrevie & Levy 2013).

Pour le développement de *Scancell*, nous avons décidé d'adopter une stratégie de déploiement en trois phases. Dans ce chapitre, nous nous attarderons tout d'abord sur les contraintes environnementales et réglementaires liées à notre activité qui nous ont poussés à construire une telle stratégie. Ensuite, nous détaillerons la succession de ces phases stratégiques et les implications spécifiques à chacune d'elles.

3.2.1 Contraintes environnementales et réglementaires liées à l'activité de *Scancell*

- *Développement et validation des tests*

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le développement et la validation des tests du package *Telocell* n'ont pas pu être achevés lors du stage de Charlotte Bertrand dans les laboratoires de *Celyad*. A l'heure actuelle, notre offre n'est donc pas encore commercialisable comme telle. Ainsi, nous devons prévoir une période supplémentaire afin d'être à même de proposer un produit fonctionnel à nos clients. Le détail des manipulations en laboratoire qui devront être réalisées avant de terminer le développement et de valider nos méthodes analytiques est présenté dans la section R&D de l'analyse opérationnelle.

- *Conformité aux normes du diagnostic in vitro (DIV)*

De plus, pour que le résultat du test soit exploitable par nos clients, ce genre de test doit se conformer à plusieurs conditions prévues au niveau européen, par la directive 98/79/CE relative aux dispositifs de diagnostic *in vitro*, et au niveau belge à travers l'arrêté royal du 14 novembre 2001 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

En effet, le package Telocell entre dans la catégorie de test de diagnostic *in vitro*, dont la définition a déjà été présentée dans le deuxième chapitre [> 2.1 Demande]. Néanmoins, il est intéressant d'en rappeler les éléments essentiels : le produit doit être destiné à une utilisation *in vitro* pour analyser des échantillons provenant du corps humain dans le but de donner une information sur celui-ci (art. 1, §2, 2°, AR, 14 novembre 2001 ; art. 1, 2, b, directive 98/79/CE).

Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* et leur commercialisation sont soumis dans chaque pays européen à des règles relativement identiques, grâce à l'uniformisation imposée et voulue par la directive 98/79/CE. Chaque loi de transposition doit respecter les conditions de la directive, ce qui facilitera la croissance du projet *Scancell*, à travers différents pays d'Europe. Le développement de *Scancell* sera limité au marché belge pour l'horizon temporel du plan financier (3 ans), ce qui nous permet, pour l'instant, de n'approfondir que les exigences belges concernant la mise sur le marché de produits comme celui que nous proposerons après une année et demie de développement dans notre laboratoire de recherche. Plusieurs exigences découlent de l'arrêté royal (AR) du 14 novembre 2001 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* ainsi que de ses annexes.

La première annexe reprend les exigences essentielles et insiste, dans son premier article, sur le fait que la conception et la production du produit doivent impérativement tenir compte de la sécurité de l'utilisateur et qu'un risque éventuel doit rester acceptable proportionnellement au bienfait apporté au patient (art. N1, A, §1 AR 14 novembre 2001). Les paragraphes suivants insistent également sur la conception, la fabrication et le transport des dispositifs qui doivent tenir compte de la technique généralement reconnue et veiller à ce qu'aucune des étapes n'amène à un risque pour le patient ou à une altération des performances du dispositif (art. N1, A, §2-§5, AR 14 novembre 2001).

Plusieurs exigences relatives à la conception et fabrication sont énumérées, parmi elles l'importance d'accompagner le dispositif des informations nécessaires pour utiliser ce dernier en toute sécurité (art. N1, B, §8, AR 14 novembre 2001). Toutes les informations devant figurer sur l'étiquetage du produit sont également spécifiées.

Une étape essentielle de la législation liée au diagnostic *in vitro* est la vérification de la conformité CE (conformité aux exigences essentielles). Plusieurs étapes et démarches décrites dans les annexes III à VII de l'arrêté, doivent être réalisées et complétées pour que le produit puisse utiliser le marquage CE.

Toutes ces exigences et conditions imposées à toute entreprise voulant commercialiser un dispositif de diagnostic *in vitro* sont basées sur la volonté des autorités publiques

d'offrir la plus grande sécurité possible. Cette sécurité est assurée par la poursuite de quatre buts principaux (Institut scientifique de santé publique n.d.). Premièrement, à travers l'AR, l'Etat cherche à offrir des garanties, tant au patient qu'à l'utilisateur du diagnostic *in vitro*, et cela à travers les exigences essentielles. Le deuxième but de cette réglementation est que les entreprises obtiennent la conformité à travers une vérification par un organisme notifié. L'arrêté décrit qui et à quelle(s) condition(s) une entreprise peut être considérée comme organisme notifié. Troisièmement, l'Etat cherche à garantir la sécurité du marché grâce à un contrôle de celui-ci. Plusieurs mesures sont mises en place : mesures de précaution (art. 8), marquage CE (art. 9), procédures de vigilance (art. 7) et mesures motivées (art. 10). Enfin, l'autorité cherche à clarifier le régime en harmonisant la législation nationale avec un arrêté unique.

Dans le cadre de la directive européenne, la Belgique a octroyé le rôle d'autorité compétente en matière de dispositifs de DIV au service qualité des laboratoires médicaux, ce service dépendant du WIV-ISP (Institut Scientifique de Santé Publique). En tant qu'autorité en charge, le service qualité des laboratoires médicaux analyse les accidents liés au DIV, organise la surveillance de ces derniers, enregistre les produits DIV mis sur le marché par les fabricants ou mandataires belges et représente la Belgique à l'étranger, en tant qu'autorité pour les DIV en Belgique (Institut scientifique de santé publique n.d.).

- *Accréditation en tant que tests de release*

Une fois nos tests validés en laboratoire et rendus conformes aux exigences du DIV, nous avons la volonté de faire de Telocell un package accrédité par les autorités de la santé – l'AFMPS en Belgique – et donc reconnu comme référence en matière de détection des cellules tumorales. Ainsi, les entreprises et les hôpitaux pourraient l'utiliser comme test de *release*, autrement dit pour autoriser l'injection d'un lot de thérapie cellulaire. Cette accréditation n'est nullement obligatoire pour la commercialisation de nos tests mais leur apporte du poids et une réelle valeur ajoutée.

Au cours de nos recherches d'informations, nous avons pu obtenir plusieurs rencontres avec les acteurs belges de la thérapie cellulaire, mais également avec l'Agence fédérale des médicaments et des produits de santé. De cette conversation, nous pouvons retenir deux informations principales.

Premièrement, il n'existe pas de conditions types qui, dans le cas où elles sont remplies, donnent directement accès à une accréditation. Au contraire, l'accréditation est un processus de négociation qui est soumis à plusieurs étapes. *Scancell* devra donc soumettre une demande à l'AFMPS dans le but de faire reconnaître à son produit destiné à la thérapie cellulaire l'accréditation officielle comme test de *release*. Cette demande

devra comporter l'ensemble de nos analyses statistiques, développements et résultats issus du laboratoire afin que les scientifiques de l'AFMPS puissent analyser scrupuleusement si nos produits ont bien les caractéristiques que nous leur attribuons. De plus, il est nécessaire que ces données aient été obtenues conformément à ce qu'imposent des normes de type ICH. Ensuite, soit l'AFMPS considère que les conditions sont remplies et nous accorde l'accréditation, soit l'organisme demande certaines modifications ou perfectionnements qui devront être apportés par *Scancell* ; le processus recommence alors. En résumé, l'accréditation en tant que tests de *release* est un processus itératif, basé sur une négociation avec les autorités de la santé. Deux interviews, avec la responsable R&D de *Bone Therapeutics* et la responsable QC de *Masthercell*, nous ont ainsi permis d'estimer la durée de ce processus, qui serait d'environ 1 an.

En ce qui concerne la possibilité qu'un produit tel que le nôtre puisse être accrédité, les représentants de l'AFMPS n'ont pu nous donner une réponse définitive. Néanmoins, selon eux, le projet est basé sur une idée solide et, si les résultats de fiabilité et de sensibilité que nous avons obtenus sont vérifiés, il y aura une grande probabilité que l'accréditation en tant que test de *release* dans le cadre des produits de la thérapie cellulaire soit accordée, mais bien évidemment, sous réserve d'une analyse en profondeur des méthodes de calculs utilisées et des expériences menées en laboratoire. En conclusion, la durée et les défis propres à l'obtention de l'accréditation pour les tests du package Telocell impliquent que nous ne pourrions pas d'emblée le commercialiser en tant que test de *release*.

- *Forme de commercialisation*

Finalement, la dernière contrainte stratégique est liée à notre marché, celui de la thérapie cellulaire. En effet, l'étude de marché réalisée auprès de la majorité des acteurs belges de ce secteur nous a permis de déterminer la forme optimale de vente de nos tests : un kit à destination des clients, contenant l'ensemble des réactifs des tests ainsi que les instructions nécessaires pour les réaliser en laboratoire (Reference MD n.d.). En comparaison avec la réalisation d'un service où les tests seraient réalisés par notre scientifique dans nos laboratoires ou dans les leurs, il s'agit de l'option sollicitée par 71% les acteurs de la thérapie cellulaire [> Annexe B Etude de marché].

Les kits présentent à nos yeux différents avantages. Tout d'abord, ils permettent une plus grande rapidité d'obtention des résultats. Ceci est particulièrement important lorsque les acteurs de thérapie cellulaire travaillent avec des cellules « fraîches », c'est-à-dire qu'ils ne passent pas par un processus de cryopréservation du produit de thérapie cellulaire (ce qui, pour rappel, est le cas de la majorité des acteurs belges). En effet, les analyses doivent dans ce cas être rapidement réalisées (de 4 à 8h après la fin

de la production du lot de « cellules-médicaments »). Le deuxième avantage des kits est leur facilité d'achat et de transport. Finalement, les kits évitent aux entreprises de devoir sortir de leurs laboratoires des échantillons de cellules qu'ils ont développés, ce qui augmente le sentiment de sécurité du processus.

Le développement de kits pour la commercialisation de Telocell implique des études supplémentaires (étude de stabilité, de durée et conditions de stockage, d'interaction composants-emballage, etc), comme nous l'a stipulé le responsable des kits chez UCB [> Annexe B Etude de marché].

3.2.2 Construction de la stratégie en trois phases

Pour nous adapter à ces différents éléments, nous avons construit une stratégie de déploiement composée de trois phases successives, résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.1 – Déroulement de la stratégie en trois phases de Scancell.

	COM-MERCIALISATION	FORME	CIBLE	ZONE GÉOGRAPHIQUE	OBJECTIF(S)	DURÉE
Phase 0	Non	N/A	N/A	N/A	Développement et validation	6 mois
Phase 1	Oui	Service	Thérapies en essais précliniques et cliniques	Belgique	Optimisation Accréditation Conformité DIV Etudes préparatoires pour la vente en kits	1 an
Phase 2	Oui	Kit	Thérapies en essais précliniques et cliniques et commercialisées	2018-2020 : Belgique 2020+ : Europe	Commercialisation à grande échelle	N/A

- *Phase 0*

Nous prévoyons le lancement de notre entreprise aux alentours du 1^{er} octobre 2016, afin d'assurer le temps d'installation et d'implémentation de nos laboratoires. Une fois l'entreprise créée, nous débiterons par une phase d'environ 6 mois - la phase 0 – au cours de laquelle nous finaliserons le développement des tests en laboratoire, et nous les validerons selon les lignes conductrices ICH. Cette phase durera environ 6 mois. Pour la mener à bien, nous disposerons de nos propres laboratoires de R&D.

- *Phase 1*

A partir d'avril 2017, nous entrerons dans la première phase de commercialisation du package Telocell . A ce moment, nous proposerons aux acteurs de la thérapie cellulaire d'utiliser nos tests à des fins de recherche et développement, pour valider leur procédé de production. Ainsi, nos tests concerneront principalement les produits de thérapie cellulaire en phase d'essais précliniques et cliniques. Les tests seront alors utilisés à titre indicatif, notamment pour le développement de la technologie de thérapie cellulaire et ensuite pour l'optimisation de la sécurité du processus de développement. La demande d'ici là sera essentiellement composée d'hôpitaux, d'entreprises, de CMO ou de CDMO en phase d'essais cliniques, qui concernent moins de patients que lors de la phase de commercialisation proprement dite, comme nous l'avons mentionné dans le deuxième chapitre [*> 2.2 Marché de la thérapie cellulaire*]. Le volume de tests Telocell réalisés sera du coup plus faible.

Durant cette première phase, nous avons choisi d'offrir les trois tests sous la forme d'un service, qui peut être résumé comme suit. Dans un premier temps, les clients nous font parvenir l'échantillon de cellules pour lequel un diagnostic tumoral est nécessaire. Les analyses sont ensuite réalisées par nos scientifiques dans nos laboratoires. Enfin, une fois les analyses effectuées, les résultats sont envoyés au client et l'échantillon est éliminé, comme il est de coutume dans le secteur. Plus de détails pratiques sur le déroulement de la production de ce service sont disponibles dans la quatrième partie [*> 4.1 Logistique*].

Afin de diminuer l'investissement initial nécessaire au projet, nous avons opté pour une structure de coûts variables. Dans cette optique, nous projetons de partager notre laboratoire de production avec une CRO existante. Ce partenariat présente de nombreux avantages supplémentaires. Le fait de bénéficier de la réputation et des nombreux contacts de cette CRO pourrait notamment dissuader certains entrants potentiels de concurrencer un acteur avec plus de poids sur le marché. De plus, en choisissant une CRO dont les laboratoires possèdent les certifications d'application pour notre activité (GMP, ISO), nous évitons des coûts supplémentaires liés à l'implémentation de ces systèmes de certification. En ce qui concerne la poursuite des activités R&D durant

cette phase – et également durant la suivante –, elle n’aura pas lieu via la location de laboratoire en partenariat avec une CRO, mais bien par l’acquisition de nos propres laboratoires, et ce dès la phase 0.

Pendant cette première période, nous focaliserons notre attention sur le marché belge. Cette première phase ciblée sur le marché belge présente plusieurs avantages pour l’implantation et le développement de *Scancell*.

Tout d’abord, cette période nous permettra de perfectionner notre offre, en l’adaptant aux remarques et demandes de nos premiers clients. Dans cette optique, la commercialisation sous forme de service est la plus adaptée étant donné qu’elle rend plus facilement réalisable toute modification non substantielle d’une des techniques.

Ensuite, la phase 1 nous permettra de réaliser non seulement les manipulations nécessaires à l’adaptation de nos tests aux exigences du diagnostic *in vitro*, mais également l’ensemble des démarches administratives et scientifiques nécessaires à l’accréditation en tant que tests de *release*. Les résultats obtenus pour les échantillons issus de recherches en milieu hospitalier et pour les essais précliniques et cliniques renforceront notre dossier auprès des autorités. De plus, la phase 1 nous permettra de mener les études nécessaires à la préparation de la commercialisation des tests sous forme de kits, forme privilégiée par le client. Dans ce but, nous entamerons un partenariat avec une entreprise de sous-traitance, spécialisée dans la confection de kits de diagnostic, telle que *Pentapharm*, société basée en Suisse.

Finalement, cette phase nous permet de générer un chiffre d’affaires dans une période où le nombre potentiel de tests est plus faible. Notre entrée en phase 2 coïncidera en effet avec la commercialisation de plusieurs produits de thérapie cellulaire, correspondant à un plus grand volume de tests d’évaluation de la tumorigénicité *in vitro*.

- *Phase 2*

Une fois nos méthodes établies en Belgique en tant que tests de *release* et *Scancell* reconnue comme l’entreprise responsable de leur accréditation, nous pourrons nous lancer dans la deuxième phase de notre stratégie. Nous prévoyons que celle-ci débutera environ un an et demi après la création de l’entreprise, ce qui nous amène aux alentours d’avril 2018. A ce moment-là, le volume de tests que nous pourrons effectuer sera nettement plus élevé. En effet, sauf retard exceptionnel, la plupart des entreprises belges de thérapie cellulaire seront entrées en phase de commercialisation d’ici à septembre 2018 au plus tard (en particulier, *Celyad*, *Tigenix* et *Promethera*).

Durant cette phase, nous ne proposerons plus de service ; nous passerons d’une proposition commerciale sous forme de service à la vente des tests sous forme de kits qui, pour rappel, est la forme privilégiée par le client lors de notre étude de marché.

Grâce à la création d'un kit de diagnostic, nous pourrions nous exporter plus aisément d'un point de vue géographique. A l'horizon 2020, nous amorcerons donc une expansion territoriale, qui sera expliquée dans une section ultérieure [> 3.6 Evolution commerciale]. Comme nous l'avons mentionné dans un paragraphe précédent, la confection des kits sera sous-traitée à une entreprise spécialisée. Ainsi, pendant la deuxième phase stratégique de notre future entreprise, la production sera décentralisée et nous pourrions pleinement nous concentrer sur la R&D.

Le caractère dual de la commercialisation de Telocell (phase 1 en service ; phase 2 sous la forme de kits) aura un impact sur l'organisation de nos ressources, mais également sur le fonctionnement opérationnel de notre future entreprise. Ainsi, dans les sections suivantes, nous ferons régulièrement référence à cette construction stratégique particulière.

Bien que cela soit peu probable étant donné la période spécifiquement accordée à son obtention, nous avons également envisagé l'éventualité de ne pas obtenir l'accréditation en tant que tests de *release*. Dans ce cas, il est possible que le volume de tests réalisés serait plus faible, étant donné que les clients seront plus difficiles à convaincre. Les solutions à cette problématique sont exposées dans la section concernant l'évolution de notre stratégie sur le long terme [> 3.6 Evolution commerciale].

3.3 Capacité stratégique

La stratégie d'une entreprise n'est pas uniquement déterminée par le couple produit/marché auquel elle s'intéresse, mais aussi par les ressources et compétences que l'entreprise possède. Celles-ci définissent sa capacité stratégique, c'est-à-dire sa capacité à faire le nécessaire pour survivre et prospérer. Tout comme l'offre, les ressources et compétences d'une entreprise peuvent elles aussi représenter un avantage concurrentiel, situé cette fois en interne (Yami 2015 ; Duguay 2014).

Les ressources regroupent l'ensemble des actifs dont l'entreprise doit disposer de manière permanente pour concevoir et mettre en œuvre sa stratégie et ses activités. On peut distinguer les ressources nécessaires qui sont à posséder afin de pouvoir s'inscrire dans un secteur d'activité des ressources uniques qui distinguent un acteur de ses concurrents (Yami 2015 ; Duguay 2014 ; Ghozzi 2010). L'ensemble des ressources de l'entreprise *Scancell* sont synthétisées dans le tableau ci-dessous. Les ressources dont nous devons absolument disposer pour lancer notre activité sont :

- financières. Nous aurons besoin d'un investissement initial de 165 000 €. Cette somme nous permettra de couvrir les frais de constitution, d'installation de laboratoires et de ses équipements ainsi que les coûts de R&D liés à la finalisation du développement et de la validation des tests. Cette somme sera complétée par la suite par un apport de financement externe, comme détaillé dans la cinquième partie - Plan financier.
- humaines. Que ce soit pour assurer la production des tests en laboratoire ou encore promouvoir notre offre auprès des acteurs de la thérapie cellulaire, nous devons bénéficier de mains et cerveaux supplémentaires. Cette donnée sera intégrée dans l'analyse opérationnelle ;
- physiques. Comme toute entreprise de biotechnologies, nous devons posséder des laboratoires équipés au sein desquels les activités de R&D et de production pourront être assurées.

Les ressources qui nous distinguent de la concurrence et qui rendent notre offre unique sont d'ordre :

- technologique. La technologie scientifique, plus précisément en ce qui concerne la détection *in vitro* des cellules tumorales, est au cœur de notre projet. Les protocoles de développement, de validation et les résultats obtenus pour chacun des tests représentent une ressource non-négligeable. Grâce à ceux-ci, nous pouvons proposer à l'industrie de la thérapie cellulaire un package peu coûteux, rapide et plus fiable que les tests actuellement présents sur le marché ;
- organisationnel. Pour exercer nos activités de R&D et de production du package Telocell, nous avons choisi de disposer de laboratoires certifiés. Ainsi, nos

laboratoires de R&D devront être soumis aux normes GLP (pour « *good laboratory practices* ») et les laboratoires de production aux normes GQCP (pour « *good quality control practices* », sous-catégories des normes GMP pour « *good manufacturing practices* »). Celles-ci nous permettront de gagner en crédibilité et d'assurer à nos clients la qualité de nos recherches et de la réalisation de nos tests.

- réputationnel. Pour convaincre le secteur de la thérapie cellulaire de notre plus-value par rapport à la concurrence, nous devons nous distinguer des entreprises déjà bien ancrées sur le marché des biotechnologies. Ceci passe obligatoirement par une approche de contact client forte et donc par la construction d'une réputation, non pas plus importante que la concurrence, mais différente. Pour cela, nous prévoyons de faire accréditer les tests auprès des autorités belges de la santé (AFMPS). Une fois cette accréditation obtenue, le package Telocell sera considéré comme un test de *release* à part entière. Son utilisation sera recommandée par les autorités et il deviendra une référence pour la thérapie cellulaire. Le choix de nos partenaires est également crucial dans la création de cette réputation.

Les compétences d'une entreprise sont les activités et processus au travers desquels elle déploie ses ressources. De la même manière que pour les ressources, on peut distinguer deux classes de compétences : les compétences seuils, qui permettent de poursuivre une activité, et les compétences distinctives, qui permettent d'obtenir un avantage concurrentiel (Yami 2015 ; Duguay 2014 ; Ghazzi 2010). Dans le cadre du projet *Scancell*, deux compétences seuils doivent être développées pour répondre aux exigences minimales de notre secteur :

- la production. Par production, nous entendons la réalisation des tests en laboratoire pour nos clients ou la création de kits de diagnostic contenant tout le nécessaire pour la réalisation des trois tests du package Telocell. La production est indispensable à notre activité, puisqu'elle est le lien entre notre offre et nos clients. Sans production, nos tests ne parviendraient pas aux clients et notre proposition de valeur n'aurait alors aucun sens.
- la logistique, tant interne qu'externe. La logistique interne permettra à l'entreprise de se fournir en matériel, consommables et équipements nécessaires pour les activités de production et de R&D. La logistique externe, quant à elle, comprendra le transport des échantillons des clients vers nos laboratoires ainsi que l'acheminement de nos kits de diagnostic vers les clients. Le caractère binaire de la logistique externe est intimement lié à celui de la production. Ainsi, la logistique est une activité indispensable au fonctionnement de l'entreprise, puisqu'elle permet la mise en œuvre de deux autres processus essentiels à notre fonctionnement : la production et la R&D.

Les compétences clés de notre business sont, quant à elles, doubles. Tout d'abord,

pour assurer la production, nous devons bénéficier d'un certain savoir-faire des tests que nous proposons. Cela signifie que, à l'aide des ressources technologiques dont nous disposons, nous devons pouvoir réaliser ces tests, ce qui implique de posséder les connaissances et l'expérience suffisantes pour comprendre les protocoles et interpréter les résultats. Par le biais de Charlotte Bertrand, nous possédons déjà ce savoir-faire ; grâce aux connaissances acquises durant ses études en biologie moléculaire et cellulaire, mais également parce qu'elle a suivi l'entièreté du développement des tests lors de son stage chez *Celyad*. La seconde compétence distinctive de notre projet est la R&D. En effet, alors qu'il s'agit d'un processus essentiel à notre fonctionnement, cette activité nous permet également de nous distinguer de la concurrence par la direction que nous choisirons de lui attribuer. En initiant des recherches innovantes et qui n'ont encore été entreprises par aucun acteur des biotechnologies, nous pouvons avoir une longueur d'avance et ainsi développer un réel avantage par rapport à ceux-ci.

Une fois les ressources et compétences du projet *Scancell* définies, il convient de déterminer si celles-ci nous permettent de développer un avantage compétitif réel et durable. Pour cela, nous utiliserons ici la technique de l'analyse VRIN, outil créé en 1991 par J.-B. Barney et qui consiste à caractériser les capacités stratégiques d'une entreprise sur base de quatre critères : la valeur, la rareté, l'imitabilité, la substituabilité (Yami 2015 ; Jurevicius 2013). Parce que seules les ressources uniques et compétences distinctives peuvent représenter un avantage compétitif, nous centrerons l'analyse VRIN sur ces catégories.

Tableau 3.2 – Ressources et compétences définissant la capacité stratégique du projet *Scancell*.

		VALEUR	RARE	IMI- TABLE	SUBSTI- TUABLE
Ressources nécessaires	Financières : 165 000 € Humaines Physiques : <i>laboratoires & équipements</i>				
Ressources uniques	Technologiques : <i>protocoles & résultats</i>	Oui	Oui	+/-	Non
	Organisationnelles : <i>GLP & GQCP</i>	Oui	+/-	Oui	Non
	Réputationnelles : <i>accréditation & partenariats</i>	Oui	Oui	+/-	Non
Compétences seuils	Logistique Production				
Compétences distinctives	Savoir-faire	Oui	Oui	+/-	Non
	R&D	Oui	Oui	Non	Non

- *Apportent-elles de la valeur à la firme ?*

Pour qu'une ressource ou une compétence constitue un avantage concurrentiel, elle doit avoir de la valeur en permettant à l'entreprise de satisfaire la demande mieux que la concurrence (Jurevicius 2013 ; Duguay 2014).

En ce sens, nos ressources technologiques ainsi que notre savoir-faire créent de la valeur, puisqu'ils nous permettent de répondre doublement aux attentes du marché de la thérapie cellulaire : à la fois pour les acteurs de la thérapie cellulaire à qui nous offrons une alternative fiable, rapide et peu coûteuse pour l'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* – et pour leurs patients à qui nous assurons une diminution du risque d' injection de cellules tumorales. Les ressources organisationnelles et réputationnelles nous permettent d'appuyer cette création de valeur grâce à une reconnaissance de notre offre par d'autres entités, réglementaires ou non. Finalement, la R&D est créatrice de valeur pour l'avenir de notre entreprise.

- *Sont-elles rares ?*

Les ressources et compétences qui ne peuvent être acquises que par peu d'entreprises sont considérées comme rares (Jurevicius 2013 ; Duguay 2014).

Comme nous allons maintenant le voir, l'ensemble des ressources et compétences clés du projet *Scancell* sont rares. Tout d'abord, nos ressources technologiques sont rares puisqu'aucun de nos concurrents ne possède les protocoles et résultats de développement et de validation de nos tests. Sur les trois tests du package Telocell, deux sont complètement absents du marché ; le troisième (la mesure de l'expression du gène *hTERT*) existe probablement déjà, mais n'est pas identique à celui que nous avons développé. Du fait de la rareté des ressources technologiques que nous exploitons, le savoir-faire spécifique à nos tests et aux protocoles qui y sont liés est lui aussi unique. En ce qui concerne les ressources organisationnelles, celles-ci sont moins rares car un certain nombre d'entreprises de biotechnologies répondent aux normes GLP et GMP. Cependant, c'est principalement le cas des entreprises développant des médicaments et non des méthodes analytiques comme nous le faisons. Nous pouvons donc constater une certaine rareté de cette ressource. L'accréditation par l'AFMPS représente la ressource la plus difficile à acquérir et nous conférerait donc un réel avantage. Finalement, bien que le département R&D soit une composante essentielle à toute entreprise biotechnologique, nous en ferons une compétence unique, une fois encore par la direction que nous lui donnerons.

- *Sont-elles imitables ?*

Le critère de l'imitabilité, c'est-à-dire la possibilité que les ressources/compétences soient reproduites par des concurrents et/ou entrants potentiels (Jurevicius 2013 ; Duguay 2014), est à nuancer dans le cadre du projet *Scancell*.

En ce qui concerne les tests en eux-mêmes, la situation est quelque peu complexe. On pourrait les considérer comme conceptuellement imitables, en ce sens qu'ils se basent sur des théories publiées dans la littérature scientifique et que leur principe pourrait donc théoriquement être reproduit. Cependant, nous pouvons jouer sur ce que Barney appelle l'« ambiguïté causale » (Jurevicius 2013). Autrement dit, nous pouvons adopter un niveau de confidentialité tel que les concurrents ne puissent identifier en détails ni le principe de nos tests ni les propriétés qui les rendent plus fiables, aussi rapide et peu onéreux. Ainsi, nous diminuerions le risque qu'ils soient reproduits par la concurrence. Mentionnons tout de même que, si jamais cela arrivait, le développement et la validation de tests conceptuellement similaires aux nôtres prendraient plusieurs mois (de 9 à 12, en fonction des moyens dont disposerait l'entreprise concurrente), ce qui nous laisserait une marge de manœuvre intéressante pour pallier ce problème. Dès le début de la vie

de notre entreprise, pour faire face à la menace d'imitabilité de nos tests et pour ne pas être dépassés par les « géants » des biotechnologies, nous prévoyons donc d'importants investissements en R&D qui nous permettront de perfectionner le package Telocell pour le rendre le moins imitable possible, mais également de diversifier notre offre.

Les normes GLP et GMP sont évidemment facilement imitables, mais la plupart de nos concurrents n'en verront aucune utilité particulière. Finalement, l'accréditation est imitable, mais on a vu l'investissement et la durée que son obtention exige. Des négociations entre l'AFPMS et *Celyad* ayant déjà été engagées concernant les tests développés par Charlotte Bertrand lors de son stage, le processus d'accréditation de Telocell sera facilité et accéléré, ce qui ne sera pas le cas de toute entreprise souhaitant obtenir une accréditation.

- *Sont-elles substituables ?*

La substituabilité est la capacité d'un concurrent à fournir un service/produit comparable (Jurevicius 2013 ; Duguay 2014).

Sur base de cette définition, nous pouvons considérer nos tests comme pour l'instant non-substituables. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent [> 2.1 Demande], bien que d'autres méthodes d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* existent, aucune solution n'est comparable à la nôtre, tant sur le plan scientifique que commercial. Cependant, il n'est pas exclu que, dans un futur proche, de nouvelles méthodes analytiques soient développées. L'investissement en R&D nous permettra de rester compétitifs face à cette possible menace. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, le développement de nouvelles méthodes par un concurrent ou un entrant potentiel devrait prendre entre 9 et 12 mois, nous laissant donc la possibilité de faire face à cette éventualité.

Les normes GLP et GQCP ainsi que l'accréditation ne sont, elles non plus, pas substituables. En ce qui concerne les normes d'organisation des laboratoires tout d'abord, une entreprise peut décider de les appliquer ou non. Dans le second cas, elle pourra choisir de respecter certaines normes ISO, mais qui n'offriront pas la même reconnaissance de qualité. L'accréditation en tant que test de *release*, ensuite, ne possède pas d'équivalent. Une entreprise choisira d'engager le travail nécessaire pour l'obtenir ou non.

En résumé de cette analyse VRIN, trois capacités stratégiques nous permettent de bénéficier d'un avantage concurrentiel durable. Tout d'abord, les ressources technologiques et le savoir-faire qui y est associé constituent un avantage compétitif temporaire de par leur menace d'imitation et de substitution. Cependant, l'accélération des recherches R&D en vue de perfectionner et diversifier notre offre nous permettra de transformer

nos tests en un avantage concurrentiel durable. Ceci illustre bien que nos tests sont au centre de notre compétitivité sur le marché. L'accréditation de ceux-ci représente également une ressource non-négligeable, puisqu'elle nous conférera un fort avantage par rapport au marché. Finalement, la R&D constitue un avantage concurrentiel durable à part entière.

Dans une œuvre plus tardive (1995), Barney a introduit une version améliorée de l'analyse VRIN – la VRIO – qui stipule que, pour que l'avantage compétitif identifié sur base de la VRIN soit durable, la firme doit également être organisée de manière à exploiter au mieux ses ressources et compétences (Jurevicius 2013). Les structures mises en place pour capturer la valeur de ces ressources et compétences clés seront décrites dans l'analyse opérationnelle de ce document.

Une autre théorie s'applique au projet *Scancell* : celle des capacités stratégiques dynamiques. Celle-ci stipule que, dans un environnement qui évolue très rapidement, la pérennité des ressources et compétences n'est pas acquise. L'entreprise doit alors pouvoir intégrer, construire et reconfigurer ses capacités stratégiques, sans quoi son offre et son mode de fonctionnement seront rapidement obsolètes et elle se fera dépasser par la concurrence (Duguay 2014). Selon Eisenhardt et Martin (Eisenhardt & Martin 2000), cette faculté de l'entreprise à rebondir rapidement implique qu'elle développe trois capacités principales :

- la capacité à développer et mettre de nouveaux produits sur le marché rapidement. Dans le cadre du projet *Scancell*, ceci sera rendu possible grâce aux importants investissements en R&D ;
- la capacité à créer de nouvelles alliances. Les partenariats sont au centre de l'organisation de l'entreprise *Scancell* et nous permettront d'accéder aux ressources et compétences manquantes ;
- un système de décision suffisamment flexible. Son fonctionnement sera adapté pour l'entreprise *Scancell*.

3.4 Diagnostic stratégique

3.4.1 Lien entre les chaînes de valeur de *Scancell* et de nos clients

La Figure 3.1 présente le lien entre la chaîne de valeur de notre future entreprise, via le produit Telocell, et celle de nos clients – les acteurs de la thérapie cellulaire. Comme on le voit, pour nos clients, les bénéfices de l'utilisation de notre produit seront multiples : une prise en charge complète de l'analyse de leurs résultats en phase 1, puis une solution de kits facilement implantable dans leurs processus internes en phase 2.

Par cette figure, nous souhaitons montrer plus précisément à quel(s) niveau(x) la création de valeur de notre entreprise intervient pour nos clients et ainsi témoigner des activités qui seront indispensables à celle-ci, activités que nous détaillerons à la section suivante. Comme la Figure 3.1 le montre, nous créons de la valeur à chaque étape de la chaîne de valeur de nos cibles, c'est-à-dire les hôpitaux, entreprises, CMO et CDMO actifs en thérapie cellulaire.

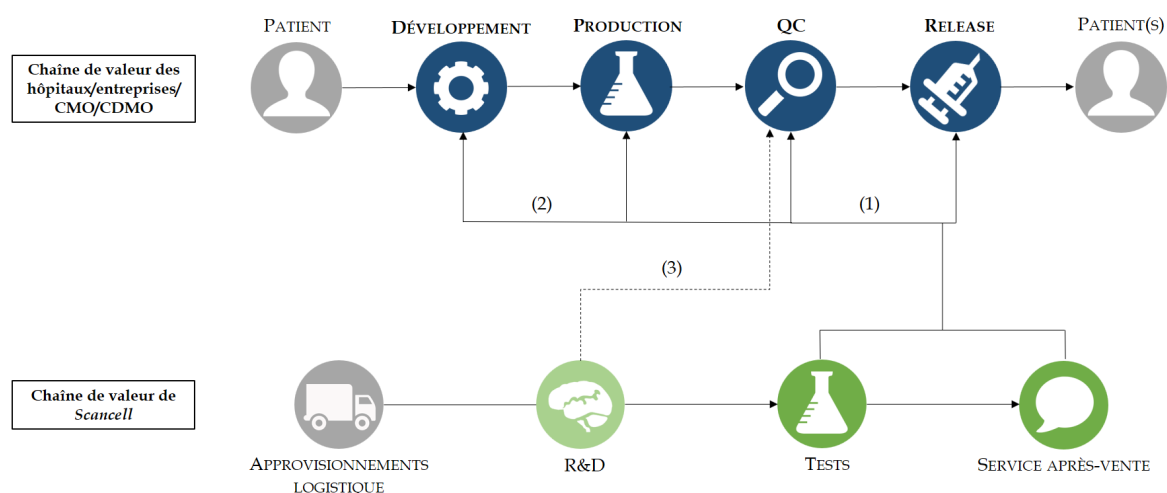


FIGURE 3.1 – Lien entre la chaîne de valeur de *Scancell* et celle de ses clients, les acteurs de la thérapie cellulaire.

Deux étapes de notre chaîne de fonctionnement créent centralement de la valeur : la réalisation des tests – qu'elle soit prise en charge par notre scientifique en phase 1 ou par le client en phase 2 -, et le service après-vente. En effet, alors que nos tests interviennent directement dans le contrôle qualité du produit de thérapie cellulaire et permettront au client de prendre une décision en ce qui concerne l'injection (« *release* ») du lot de thérapie cellulaire (Figure 3.1, point (1)), les résultats qui en sont issus permettront également d'optimiser le procédé de production d'une thérapie cellulaire et, par là même, interviendront dans le processus de développement de nos clients (Figure 3.1,

point (2)). Le dialogue que nous établirons avec eux, au travers du service après-vente, pourra, lui aussi, contribuer à l'amélioration des technologies de production des lots cellulaires de nos clients. De plus, bien qu'il s'agisse d'une activité de soutien, la R&D est un pôle important de notre création de valeur, qui créera indirectement de la valeur en permettant d'optimiser et d'élargir notre offre (Figure 3.1, point (3)).

Les résultats fournis par nos tests et le service après-vente, couplés à la mise en place d'une dynamique R&D forte, sont donc à la base de notre création de valeur car ils nous permettront de remplir notre mission, à savoir fournir des tests de qualité en ce qui concerne la détection *in vitro* des cellules tumorales permettant aux acteurs de la thérapie cellulaire de décider de manière fiable du sort des lots de thérapie cellulaire et, par là même, d'assurer la sécurité des patients de ce secteur.

Pour assurer ces points clés de notre création de valeur, diverses activités principales et de soutien doivent être mises en place ; c'est ce que nous allons maintenant détailler.

3.4.2 Activités principales et de soutien

Dans son modèle de chaîne de valeur, Porter distingue deux types d'activités créatrices de valeur pour l'entreprise : les activités principales, qui mènent directement à la création ou vente du produit et les activités de soutien, qui contribuent aux liaisons entre les différentes activités principales (Ritzman & Krajewski 2010).

L'étude de notre propre chaîne de valeur (Figure 3.2) est l'occasion de résumer le fonctionnement opérationnel de *Scancell*, avec certains ajustements en fonction de la phase de développement stratégique dans laquelle le projet se trouve [**> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases**].

Dans les activités principales, on retrouve la logistique, la production et le transport. La logistique interne occupe une place relativement importante, puisque dans un premier temps, la rotation des stocks sera faible, au vu de la demande fluctuante. La date limite de consommation (DLC) des réactifs, couplée à un délai de livraison assez court, permettront cependant de limiter l'importance de cette activité.

La production quant à elle sera divisée en deux phases, comme nous l'avons expliqué en début de chapitre, ce qui implique des différences de gestion de l'activité. En effet, dans un premier temps, les échantillons de nos clients seront analysés en interne par nos techniciens, là où nous nous contenterons en phase 2 de faire fabriquer et transporter nos kits déjà emballés afin que ceux-ci puissent être utilisés par nos clients, sans intervention extérieure.

Fonctions de soutien	INFRASTRUCTURE • Physique : laboratoires • Juridique : PI, DIV, accréditation • Financière				
	GESTION DES RESSOURCES HUMAINES • CEO externe • Technicien • Employé commercial • Facteurs d'engagement et de productivité				
	RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT Compléter, perfectionner et élargir notre offre				
	APPROVISIONNEMENTS • Consommables et matériel pour la production et la R&D • Relation fournisseur				
Fonctions primaires	PRODUCTION • Phase 1 : service • <i>Phase 2 : kit (externalisé)</i>	LOGISTIQUE INTERNE • Gestion des approvisionnements et stocks • Phase 2 : distribution kits EXTERNE • <i>Phase 1 : transport cellules (externalisé)</i> • <i>Phase 2 : transport kits (externalisé)</i>		MARKETING ET VENTES • Communication B2B • Phase 1 : R&D pour les produits en dvpt • Phase 2 : test de release	SERVICES • Phase 1 : prise en charge complète (échantillonnage – analyse des résultats) • <i>Phase 2 : notice technique d'utilisation</i> • Service après-vente

FIGURE 3.2 – Chaîne de valeur selon Porter de Scancell.

Le transport sera sous-traité dans tous les cas, car la gestion du froid et l'importance du timing dans notre activité rend cette opération délicate. En ne la réalisant pas nous-même, nous diminuons le risque sous-jacent et évitons d'inutiles investissements initiaux. Ceci s'inscrit donc dans notre stratégie de diminuer les coûts fixes. Par contre, le transport évoluera entre nos deux phases stratégiques. En phase 1, les échantillons de cellules seront transportés dans des conditions permettant d'assurer leur stabilité depuis le client vers nos laboratoires, afin de procéder à leur analyse en interne. Ces lots cellulaires sont à usage unique et ne sont pas retournés chez le client ; il n'est donc pas nécessaire d'avoir un second échange de transport de matériel. En phase 2 par contre, nos kits seront livrés vers nos clients, qui prendront alors en charge le stockage selon les consignes que nous leur fournirons. Mentionnons tout de même qu'en phase 2, nous jouerons le rôle de distributeur des kits Telocell, étant donné que ceux-ci doivent repasser par nos laboratoires post-production, pour y intégrer le contrôle tumoral personnalisé.

Dans les activités de soutien, l'infrastructure revêt une importance prépondérante. Sous ce terme pourtant vague se cachent en réalité plusieurs éléments clés pour notre entreprise. Le soutien juridique notamment, permettra de protéger notre technologie en contrôlant l'épineuse question de la propriété intellectuelle, notamment via l'accord avec *Celyad*, et en suivant régulièrement les évolutions fréquentes de la législation, notamment pour l'accréditation et le diagnostic *in vitro*. Matériellement, nos laboratoires aux normes GMP (GQCP) pour la production et GLP pour la partie R&D seront eux

aussi un élément indispensable de notre création de valeur.

En ce qui concerne les approvisionnements, c'est-à-dire l'achat de matières premières et de consommables nécessaires à la réalisation des activités de production et de R&D, une attention particulière devra être apportée au contrat établi avec nos fournisseurs. Notamment, les délais de livraison des matières premières devront être scrupuleusement respectés, sans quoi la production - gérée par nos soins en phase 1 - sera retardée, ce qui aura un impact négatif sur le délai de transfert des résultats au client. De plus, nous devons entretenir une relation plus spécifique avec l'entreprise *Roche*, étant donné que nous utilisons certains de leurs consommables difficilement remplaçables dans les protocoles de nos tests. Les tenants et aboutissants de la relation avec ce fournisseur seront envisagés dans le quatrième chapitre [> 4.6 Gestion des relations commerciales].

Un point supplémentaire d'importance est la motivation intrinsèque de nos futurs collaborateurs, composante cruciale pour la gestion des ressources humaines. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, notre projet s'inscrit dans un secteur qui permettra à terme d'améliorer le quotidien de millions de personnes à travers le monde. A fortiori, dans une start-up, nous comptons sur le fait que l'engagement de nos collaborateurs soit supérieur à la normale grâce, justement, à cet aspect humain valorisant. En effet, être passionné par les objectifs à long terme d'une entreprise, posséder une motivation intrinsèque au projet, est un indicateur de performance au travail (Chamorro-Premuzic 2013).

Enfin, la recherche et développement présente une double création de valeur pour *Scancell*. D'une part, de par la composition-même de nos tests et l'expertise liée à ceux-ci : le développement et la validation de ces tests sont en effet la base de notre entreprise et la majeure partie de la création de valeur que nous offrons. D'autre part, dans le cadre de développements futurs et de notre ambition de devenir le *leader* européen de la détection de cellules tumorales, la R&D est un département dans lequel il sera nécessaire d'investir de manière importante pour se maintenir à jour et rester compétitif.

3.5 Choix stratégiques

3.5.1 Cibles

Les cibles de *Scancell* sont multiples et chacune a ses caractéristiques spécifiques et son importance pour la rentabilité de l'entreprise. Il est cependant possible de les regrouper toutes sous le même descriptif : nous ciblons tout acteur ayant un lien direct avec la production et/ou le contrôle de qualité de lots de cellules humaines destinées à la thérapie cellulaire et à l'injection chez l'être humain.

Excluons donc de ces cibles le patient et les centres de recherche fondamentale. Si l'amélioration de la vie d'un patient est notre motivation première, celui-ci ne représente en aucun cas une cible commerciale ; il n'a pas de droit de regard sur les méthodes utilisées par les entreprises et hôpitaux pour vérifier la sécurité de leur thérapie cellulaire. Nous ne ciblons pas non plus les laboratoires/centres de recherche fondamentale. Bien qu'une collaboration avec ce type d'acteur soit intéressante car elle nous permettrait de demeurer à la source de la génération de connaissances utiles à tout développement ultérieur de méthodes thérapeutiques ou de diagnostic, l'investissement destiné à convaincre les laboratoires de recherche fondamentale ne serait pas rentable, étant donné le faible volume de tests que cela impliquerait pour nous. De plus, le caractère plus aléatoire de l'utilisation des tests de détection *in vitro* des cellules tumorales - tant dans le temps que dans l'application qui en est faite - rend ce secteur moins facilement modélisable. Par sécurité, nous avons donc préféré ne pas considérer les centres de recherche fondamentale comme cible commerciale privilégiée dans nos analyses.

Les cibles de *Scancell* sont donc les hôpitaux, les entreprises de thérapie cellulaire, et les CMO ou CDMO. Ces acteurs représentent un potentiel commercial plus important.

- *Entreprises de thérapie cellulaire*

Notre cible principale est représentée par l'entière des entreprises actives dans le développement de thérapies cellulaires. Par ces termes, nous visons tant les entreprises ayant développé un produit de thérapie cellulaire que celles en plein développement (essais précliniques et cliniques) de leur thérapie et ayant l'intention de la commercialiser dans les années à venir.

De plus, pour des raisons de rentabilité, nous visons préférentiellement les acteurs développant des produits de thérapie cellulaire autologue. Pour rappel, l'administration autologue d'une thérapie cellulaire consiste à prélever le matériel cellulaire initial chez un patient et à réinjecter les cellules-médicaments chez le même patient. En transfert

autologue, un lot de cellules-médicaments correspond donc à un patient. Le nombre de lots produits est donc plus important qu'en administration allogénique (où un lot de cellules-médicaments peut être injecté à plusieurs patients différents), ce qui implique la réalisation d'un nombre plus élevé de tests de contrôle qualité. De manière générale, en Europe, la thérapie cellulaire autologue est majoritaire, comme c'est le cas en Belgique où environ 60% des produits de thérapie cellulaire recensés sont associés à un transfert autologue [> Annexe B Etude de marché].

- *C(D)MO : Contract (Development) Manufacturing Organizations*

Comme nous l'avons précédemment exprimé, les CMO et CDMO sont des entreprises proposant des services de production avec des volumes de capacité variables. De telles entreprises existent dans le secteur de la thérapie cellulaire et agissent de manière équivalente à des sous-traitants. La différence entre CMO et CDMO réside dans le fait que les CMO se contentent d'assurer la production d'une thérapie cellulaire, alors que les CDMO proposent non seulement des services de production mais aussi un service d'accompagnement et/ou de prise en charge du développement de la thérapie cellulaire.

Etant donné qu'elles prennent en charge la production des lots de cellules-médicaments, les CMO et CDMO s'occupent également du contrôle de qualité des échantillons après la production.

Il est également intéressant de mentionner la tendance évolutive du marché en ce qui concerne la balance entreprises/C(D)MO. En effet, alors que la plupart des entreprises de thérapie cellulaire sont actuellement en phase de développement, la plupart d'entre elles ont, dans leurs rapports d'actionnariat, émis la volonté de sous-traiter leur production une fois l'autorisation de mise sur le marché de leur thérapie obtenue, et ceci dans le but de se concentrer sur la recherche et le développement de nouveaux produits associés. Ainsi, l'importance des C(D)MO en tant que cible de *Scancell* risque fortement d'augmenter au fur et à mesure des années.

- *Hôpitaux universitaires et indépendants*

Dans une idée de diversification des clients, nous nous sommes penchés sur d'autres possibilités et notre intérêt s'est posé sur cette troisième et ultime cible : les hôpitaux.

La plupart des universités belges possèdent à l'heure actuelle un hôpital au sein duquel des études consacrées à la thérapie cellulaire sont réalisées [> Annexe B Etude de marché]. Cependant, il existe également des hôpitaux indépendants des universités. Au sein de ces établissements sont menées des recherches appliquées, c'est-à-dire

concernant un stade plus avancé de développement d'une thérapie cellulaire. Ainsi, les hôpitaux auraient le même usage de nos tests que nos autres cibles, à savoir l'optimisation de leurs procédés de production ainsi que l'évaluation de la sécurité d'un lot de cellules-médicaments avant injection. Les hôpitaux représentent une cible d'importance stratégique intéressante. En effet, ces acteurs sont bien souvent à l'origine d'une nouvelle thérapie cellulaire et collaborent avec certaines entreprises privées dans le but de transférer ces recherches du laboratoire au patient. Cette cible nous permettra donc de suivre les évolutions les plus innovantes en matière de thérapie cellulaire, et d'approcher d'autres acteurs de manière relativement précoce.

3.5.2 Positionnement concurrentiel

La définition du positionnement concurrentiel a pour objectif de situer un produit ou une entreprise par rapport à la concurrence. Plus précisément, nous cherchons ici à déterminer le type de stratégie que nous adoptons pour nous distinguer de la concurrence, qu'elle soit directe ou indirecte (Université de Caen n.d.). Comme nous l'avons déjà mentionné, le succès de notre entreprise passe par la création d'une réputation, non pas plus importante, mais différente. Dans cette optique, l'explication de notre positionnement concurrentiel prend tout son sens. Elle reflète en effet l'image que nous dégageons par rapport à l'ensemble du marché. Pour exprimer notre positionnement concurrentiel, nous utiliserons deux outils stratégiques : l'horloge de Bowman (Figure 3.3) et la cartographie concurrentielle (Figure 3.4).

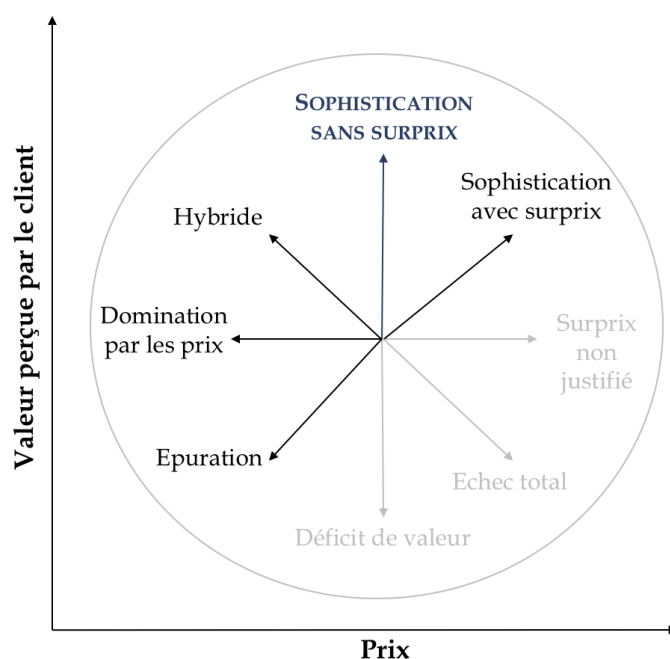


FIGURE 3.3 – Horloge de Bowman montrant le positionnement concurrentiel de Scancell.

Selon la terminologie de Bowman (Bowman & Faulkner 1996), notre positionnement concurrentiel consiste à adopter une stratégie de « sophistication sans surprise » (Figure 3.3). Notre produit offre en effet une plus haute valeur perçue par le client à un prix similaire, bien qu'il soit actuellement inférieur à la majorité des solutions utilisées sur le marché. Nous allons maintenant argumenter ces deux aspects.

- *Valeur perçue par le client*

Le secteur de la thérapie cellulaire, et plus généralement tous nos clients potentiels, percevront le produit Telocell comme une alternative de qualité, qui rajoute de la valeur par rapport aux méthodes existantes. En effet, en utilisant Telocell, l'utilisateur peut s'assurer de façon beaucoup plus fiable et rapide que les lots cellulaires à injecter sont exempts de cellules tumorales. Pour rappel, la fiabilité de notre package réside en (i) la combinaison de trois tests complémentaires, (ii) l'analyse d'une caractéristique universelle des cellules tumorales, (iii) une grande sensibilité de nos méthodes et (4) la génération d'un résultat adapté grâce à la fonctionnalité « personnalisation du contrôle ». Aucune des méthodes classiques d'évaluation de la tumorigénicité *in vitro* actuellement utilisées en thérapie cellulaire ne possèdent ces avantages. De plus, nous fournissons une qualité supérieure à la concurrence directe grâce aux arguments 1 et 4. Qualifier notre positionnement concurrentiel de « sophistication » est donc totalement justifié, étant donné que la plus grande fiabilité de Telocell.

- *Prix*

Ces engagements de qualité, fiabilité et rapidité s'accompagnent de prix pour l'instant inférieurs à ceux de la concurrence directe et indirecte. Ceci est rendu possible grâce à la mise en place d'une stratégie de diminution des coûts. Nous utilisons en effet la technique de qPCR, moins onéreuse que ses substituts (tant par le coût de l'équipement que des consommables associés).

Bien que le prix constitue un argument de taille pour convaincre les acteurs de la thérapie cellulaire d'utiliser nos tests, notre stratégie n'est pas de dominer le marché par les prix mais plutôt de fournir des méthodes fiables où prime la qualité du produit. La sophistication est bien l'élément central de notre stratégie concurrentielle, et c'est pour cette raison que nous n'avons pas opté pour une stratégie hybride. De plus, ce prix pourrait évidemment être amené à évoluer au cours du temps avec les progrès technologiques et l'augmentation de l'intensité concurrentielle. Notre objectif sera alors de continuer à nous différencier par la pertinence de nos solutions, et non pas en cherchant le moindre coût.

Si l'on compare plus précisément le rapport fiabilité/attractivité commerciale (exprimée en termes de rapidité et de prix de vente) de Telocell vis-à-vis des méthodes

alternatives les plus courantes, on obtient le résultat suivant (Figure 3.4).

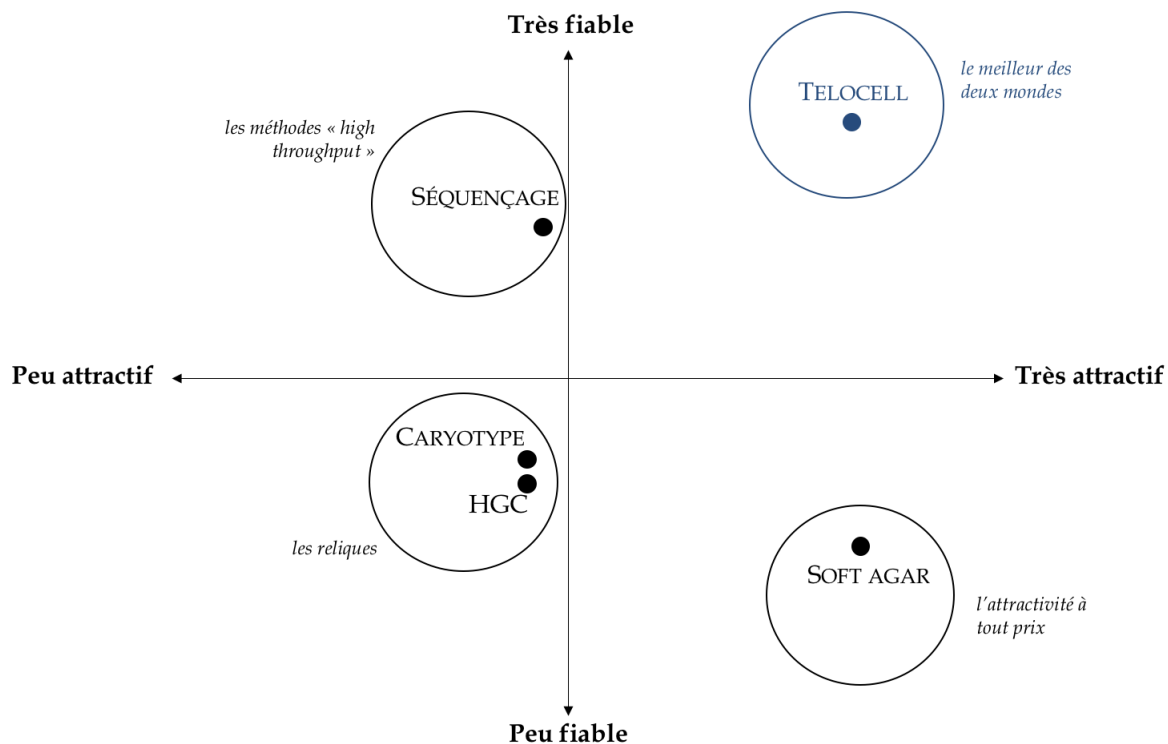


FIGURE 3.4 – Cartographie concurrentielle montrant le positionnement éponyme de Scancell, en termes de fiabilité et d'attractivité commerciale (durée et prix) en comparaison avec les méthodes alternatives.

Parmi les méthodes existantes de détection *in vitro* des cellules tumorales, les moins récentes sont le caryotype et le test HGC, dont les principes de base sont relativement proches. Ces deux méthodes sont à la fois peu fiables - principalement à cause de leur faible sensibilité (10 et 8%, respectivement) - et peu attractives, étant donné leur prix et leur durée.

Le test soft agar représente une bonne alternative à ces « reliques » en ce qui concerne l'attractivité commerciale ; sur le marché, ce test est actuellement le moins cher (350 € par échantillon). Cependant, sa très haute limite de détection (évaluée à 37,5% selon notre étude scientifique) limite fortement sa fiabilité.

Les méthodes dites « *high throughput* », dont le séquençage fait partie, génèrent un grand nombre de données et attirent de plus en plus l'attention des autorités de la santé, selon le responsable de la R&D chez Celyad, Peter de Waele. Celles-ci sont en effet relativement sensibles (la LOD du séquençage vaut 1%), ce qui les rend plus fiables que la moyenne. Cependant, leur prix élevé les rend très peu attractives pour les acteurs de la thérapie cellulaire.

Telocell, une solution plus fiable que le séquençage (pour les raisons 1, 2 et 4 évoquées ci-dessus) et aussi attractive que le soft agar (car nous sommes plus chers mais aussi plus rapides) représente donc le meilleur des deux mondes, ce qui justifie pleinement notre positionnement de « sophistication sans surprise ».

3.6 Evolution commerciale

3.6.1 Positionnement sur le marché

Comme nous l'avons développé dans le chapitre précédent, le marché que nous visons est très jeune, et possède actuellement un faible nombre d'acteurs. En particulier, la solution que nous proposons est pionnière puisqu'elle apporte une technologie qui, actuellement, n'est pas utilisée en thérapie cellulaire. En tant que premier entrant, nous bénéficierons donc d'un certain nombre d'avantages (Gotteland, 2000). Parmi ceux-ci, plusieurs sont liés aux relations avec nos clients, notamment l'augmentation de la fidélité à la marque, et l'image positive qui y est associée. L'effet d'expérience, qui est un avantage en coût unitaire, survient par l'optimisation des procédés grâce à l'important volume de production réalisé depuis la création de l'entreprise.

D'un point de vue stratégique (Lieberman & Montgomery, 1988), le premier entrant peut choisir les segments de marché les plus rentables, tout en positionnant son produit de manière optimale, grâce à une meilleure connaissance du marché.

A ces avantages intéressants, il convient cependant d'opposer quelques inconvénients auxquels sont exposés spécifiquement les pionniers. L'important coût en R&D par exemple, ou le risque de proposer un produit qui n'est pas techniquement optimal. Dans notre cas, le risque lié à l'offre éventuelle d'un marché de substitution est important, et convient d'être tenu attentivement à l'œil. Une attention particulière sera donc consacrée à l'étude de l'évolution des technologies et leur accréditation par les autorités légales, ainsi qu'à nos investissements en recherche et développement pour contrer d'éventuelles alternatives à nos tests.

Concernant la part de marché que nous souhaitons nous attribuer, nous avons défini un seuil de 15% des analyses tumorales QC dans le cadre d'essais cliniques réalisés en Belgique, que nous souhaitons atteindre au bout de la première année. Cette valeur correspond à l'estimation du nombre de patients traités par les essais cliniques des trois entreprises ayant montré un intérêt commercial sérieux pour Telocell (*Bone Therapeutics*, *Celyad* et *Promethera*), plus une quatrième encore inconnue aujourd'hui que nous démarcherons commercialement dans les mois à venir. Pour le reste du développement du plan financier, nous considérons que les produits commercialisés suite à ces études cliniques utiliseront nos kits dans le cadre de leur production, à l'exception des produits commercialisés en 2017 (C-Cure® de *Celyad* et de Hepastem de *Promethera*). Nous considérons que ces produits sont aujourd'hui trop avancés dans leur développement pour espérer changer leurs procédés avant leur commercialisation, puisque notre technologie sous forme de kits ne sera disponible qu'au début de notre phase 2 en 2018. Cette

évolution nous permettra d'atteindre une part de marché de 5% de la totalité des tests de *release* réalisés en Belgique après trois ans d'exercice. La diminution de part de marché provient donc de la non-comptabilisation de ces deux produits qui représentent un nombre important de tests de *release* réalisés, mais que le principe de prudence financière nous impose de ne pas comptabiliser. Dans la pratique, l'évolution de nos parts de marché se fera vraisemblablement selon une courbe qui alterne importantes augmentations et stabilisations. En effet, chaque entreprise convaincue par notre produit nous apportera un important sursaut de production, au vu du faible nombre d'acteurs sur le marché.

De plus, l'évolution devrait être lente au début, pour s'accélérer très rapidement une fois notre technologie mise au point et la confiance du marché obtenue, c'est-à-dire en début de phase stratégique 2. La structure du marché, constamment en évolution, implique logiquement que le nombre de tests de *release* réalisés par an sera organiquement en augmentation ; croissance qui se répercutera dans nos volumes de vente au fur et à mesure de la commercialisation des produits de thérapies cellulaires et géniques.

3.6.2 Intégration opérationnelle

Comme nous l'avons développé précédemment dans cette partie, plusieurs activités clés pour l'entreprise nécessitent une infrastructure et organisation particulière. La R&D par exemple, tout comme la réalisation de service en phase 1, impliquent un accès quotidien à un laboratoire conforme aux normes en vigueur. De même, le transport des échantillons de cellules d'abord et de nos kits ensuite nous impose une logistique bien rôdée, à cause des conditions de conservation particulières de notre produit, ainsi que de leur DLC (date limite de conservation). Cependant, posséder son propre laboratoire, ou acquérir une expertise dans le transport coûte très cher en temps et en argent. Pour ces raisons, il nous paraît indispensable de nous entourer, du moins dans un premier temps, de solides partenaires, avec qui nous pourrions par exemple partager un laboratoire pour assurer notre production. Ces collaborations stratégiques seront développées plus tard dans l'analyse opérationnelle.

Une fois que l'entreprise se sera suffisamment développée, deux scénarii principaux de développement sont à envisager.

Premièrement, l'acquisition en interne des compétences qu'auparavant nous soustraisons. Par exemple, la production des kits ou le transport des échantillons pourraient être réalisés directement par *Scancell*. Cette solution implique un besoin en financement important, qui peut s'acquérir soit via notre activité elle-même, la vente de kits, soit via la réalisation de *rounds* de financement qui demandent un long temps de préparation à cause des différentes procédures et obligations légales. Les différentes procédures de financement seront étudiées dans le plan financier.

Une deuxième possibilité, courante dans les secteurs à forte innovation, est la possibilité de se faire intégrer dans une plus grande structure suite à un rachat. A priori, cette option n'est pas la favorite des porteurs de projet par principe idéologique, mais elle pourrait s'avérer nécessaire pour passer à un stade ultérieur de développement, ce qui serait une manière de perpétuer le projet sur le plus long terme.

3.6.3 Expansion territoriale

Dans un premier temps, les deux phases de commercialisation se focaliseront sur la Belgique. En effet, ce territoire a l'avantage de présenter un nombre élevé d'acteurs de la thérapie cellulaire en comparaison avec sa superficie. Comme nous l'avons expliqué dans la présentation du marché, la Belgique est considérée comme la « *cell therapy valley* », car elle héberge la plupart des entreprises les plus avancées et influentes dans ce domaine (notamment, *Tigenix*, *Celyad* et *Bone Therapeutics*). Peu de pays, de régions comptent autant de projets en développement autour de la thérapie cellulaire que la Région wallonne ; c'est donc un terrain de mise en orbite privilégié.

Cependant, la thérapie cellulaire représente un marché de niche qui, bien qu'il ait le mérite de ne pas devoir nous confronter directement aux géants de l'industrie, présente une série de facteurs bloquants pour notre entreprise (Dauzat 2013). Tout d'abord, cibler un marché de niche implique de gérer de plus faibles volumes. Ceci est d'autant plus le cas pour le secteur de la thérapie cellulaire de par la nouveauté de ce marché. En effet :

- le nombre d'acteurs de la thérapie cellulaire (hôpitaux/entreprises/C(D)MO) est relativement faible en Europe. Bien que la Belgique présente un bon rapport nombre d'acteurs/superficie, la quantité de clients potentiels y reste insuffisante pour un développement à long terme. De plus, le nombre limité de clients génère un certain risque au sein du projet, étant donné que, dans ces conditions, la perte d'un seul d'entre eux peut conduire à la faillite de l'entreprise (Dynamique entrepreneuriale 2014) ;
- en raison de l'émergence du secteur, la plupart des acteurs sont encore au stade de mise au point ou d'études cliniques. Aucune thérapie cellulaire commercialisée n'est actuellement produite en Belgique, et les entreprises actives sur ce marché ne commercialiseront rien avant 2017, ou 2020 pour les moins avancées.

Ainsi, les perspectives de croissance sont relativement limitées sur les marchés de niche (Dynamique entrepreneuriale 2014). Afin de limiter les risques liés à notre activité, nous envisageons donc une expansion territoriale sur d'autres marchés européens à l'horizon 2020. Cette expansion géographique est rendue possible par la vente de nos tests sous la forme d'un kit, à partir de la phase 2.

La thérapie cellulaire est encadrée au niveau européen par le règlement concernant les médicaments de thérapie innovante (Règlement CE/1394/2007) (ATMP, pour « *advanced therapy medicinal product* ») parmi lesquels figure la thérapie cellulaire. Ce règlement assure à tous les patients européens l'accès à des traitements de ce type et il vise à accroître la compétitivité de l'Union européenne dans ce secteur de la biotechnologie (EC 2015). Il est également important de noter que ce règlement a pour but d'assurer la protection de la santé des patients. On peut percevoir de manière générale que l'Union européenne désire harmoniser de plus en plus le droit pharmaceutique notamment à travers un règlement sur les médicaments de thérapies innovantes. Néanmoins, comme l'harmonisation a parfois été faite à travers des directives (Directive 2004/23/CE), la mise en place des exigences de la directive européenne peut varier en fonction des Etats, ce qui complexifie la vie des entreprises de thérapie cellulaire (Martens & Carbonelle n.d.).

Pour *Scancell*, cela signifie que, grâce à l'harmonisation imposée par les instruments légaux européens, il est probable de voir apparaître des entreprises développant des produits de thérapie cellulaire dans l'entière des pays européens ; ceci nous ouvre un grand marché. En effet, comme l'ont relevé Martens et Carbonelle, une harmonisation plus importante des réglementations liées aux médicaments de thérapie innovante facilitera le développement d'entreprises de thérapie cellulaire et la mise sur le marché de leur produit (Martens & Carbonelle n.d.).

Les premières années du projet, qui serviront à finaliser l'accréditation de nos procédés, permettront également de nous familiariser avec ces différents acteurs étrangers. Certaines entreprises de consultance en Belgique sont spécialisées dans les biotechnologies et nous feront bénéficier de leur expertise en temps utile, ce que nous expliquait Bernard Adant de *Biotech Quality Assistance*.

3.6.4 Stratégie de diversification à moyen terme

Comme nous l'avons évoqué dans notre vision, nous avons pour ambition de devenir les *leaders* européens dans la détection des cellules tumorales *in vitro*. Pour cela, nous prévoyons de nous spécialiser dans le développement et la validation de méthodes analytiques destinées à l'évaluation de la tumorigénicité.

La diversification de notre offre nous permettra ainsi, à partir de la deuxième phase stratégique, de diversifier notre classe client et de nous ouvrir à d'autres marchés que celui de la thérapie cellulaire. Le secteur que nous avons identifié comme le plus intéressant pour permettre à l'entreprise d'évoluer et de grandir est celui des médicaments anticancéreux (ou « *anticancer drug discovery* »), secteur dont de nombreuses entreprises pharmaceutiques belges (comme les géants *GlaxoSmithKline*, *Novartis*, *Pfizer* et *Sanofi*) font partie. Depuis le début des années 2000, ce marché connaît une réelle explosion,

puisqu'il génère plusieurs dizaines de milliards de dollars chaque année, avec une croissance annuelle moyenne de 6,4% (Mullard 2015a ; CellMid n.d.). Les entreprises actives sur ce secteur investissent énormément dans ces activités prometteuses. Ainsi, le marché mondial des médicaments anti-cancéreux a dépensé près de 100 milliards de dollars en 2014 pour assurer le développement de ses thérapies, et une dépense de 117 à 147 milliards est prévue pour 2018 (Mullard 2015b).

Comme la figure ci-dessous le montre, le processus de *drug discovery* débute par l'analyse de plusieurs milliers de composés potentiellement actifs contre une cible du cancer. Au fur et à mesure des étapes de développement, qui comprennent des études précliniques et cliniques, certaines molécules sont sélectionnées. *In fine*, un seul composé est commercialisé suite à l'obtention de l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). En tout, ce processus prend en moyenne une quinzaine d'années.

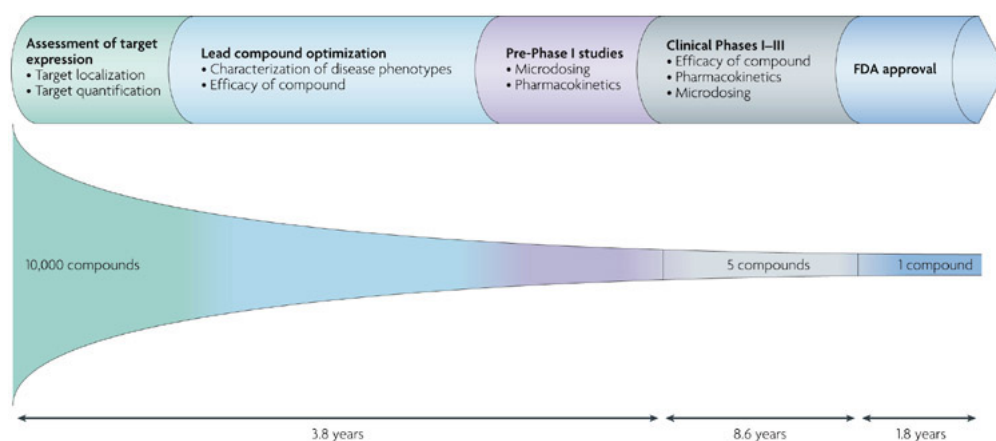


FIGURE 3.5 – Processus de développement d'un médicament anti-cancéreux (Willmann et al. 2008).

La détection des cellules tumorales peut intervenir à deux étapes clés de ce processus. Tout d'abord, lors des étapes précliniques, les entreprises devront vérifier l'efficacité des différentes molécules candidates, c'est-à-dire leur capacité à « tuer » les cellules tumorales. Dans ce cadre, elles doivent disposer de tests de détection des cellules tumorales *in vitro* qui permettront de vérifier qu'un échantillon cellulaire traité avec le composé anti-cancéreux contient moins ou ne contient plus aucune cellule tumorale. Notons que le contexte est relativement propice, puisque la majeure partie des entreprises actives sur le secteur des médicaments anti-cancéreux se situent en phase d'études précliniques (Figure 3.5). Lors des études cliniques ensuite, l'efficacité du produit sur l'humain sera également analysée, et les entreprises devront alors bénéficier de tests de détection des cellules tumorales *in vivo*.

Bien que ce marché soit très attractif, nous ne pouvons pas nous y attaquer dès la création de notre entreprise, et ce pour deux raisons principales. Tout d'abord, comme nous l'avons évoqué, l'utilisation de tests de détection des cellules tumorales aurait un

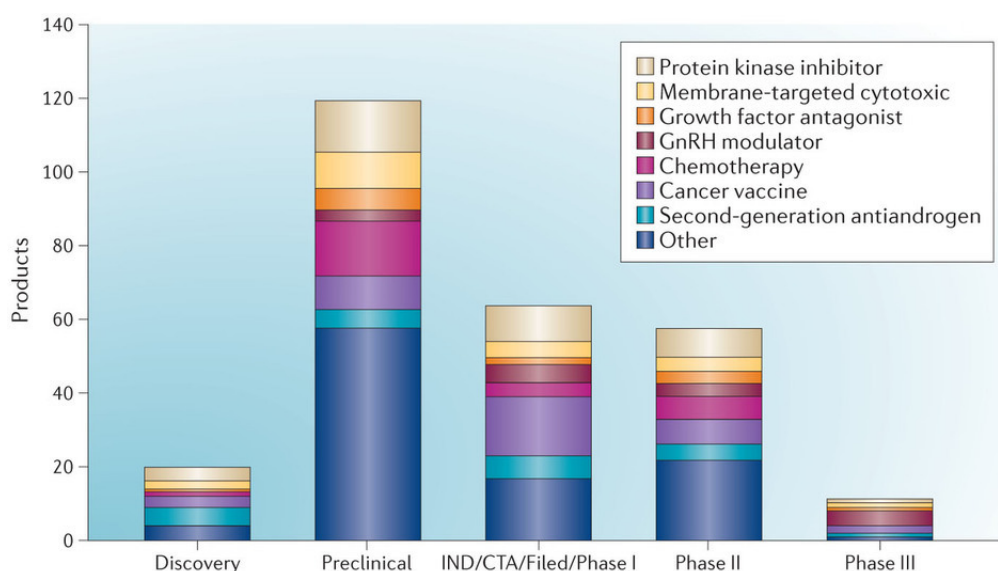


FIGURE 3.6 – Position des produits anti-cancéreux dirigés contre la prostate, par catégorie, sur la chaîne de développement. La situation thérapeutique du cancer de la prostate est représentative de la situation globale en ce qui concerne les thérapies anti-cancéreuses actuelles (Trewartha & Carter 2013).

intérêt pour l'évaluation de l'efficacité *in vitro* de composés anti-cancéreux. Plus qu'une simple évaluation, la quantification de cette efficacité permettra de discriminer une molécule candidate par rapport à une autre. Le package Telocell actuellement développé sous la forme de tests limites ne permet pour l'instant pas cette quantification. Si nous souhaitons le proposer au marché des médicaments anti-cancéreux, des développements supplémentaires devront être réalisés pour le transformer en package quantitatif. Le second élément qui nous pousse, dans un premier temps, à rester sur le marché de la thérapie cellulaire est que celui des médicaments anti-cancéreux est moins ouvert. En effet, il comprend un plus grand nombre d'acteurs dont la plupart y sont déjà bien ancrés. Les entreprises de *drug discovery* ont eu le temps de créer des alliances solides. De plus, le besoin de tests de détection des cellules tumorales y est probablement moins fort que pour la thérapie cellulaire puisque les acteurs du *drug discovery* disposent de structures et de moyens financiers plus importants pour mettre au point leurs propres méthodes, adaptées à leurs procédés. A la création de l'entreprise *Scancell*, nous estimons donc complexe de convaincre ces entreprises d'abandonner leurs méthodes et partenaires.

Pour ces raisons, nous avons choisi d'inclure le marché des médicaments anti-cancéreux dans notre stratégie à moyen terme (horizon 2020) et prévoyons de l'aborder une fois que les développements scientifiques et organisationnels nécessaires auront été accomplis, mais surtout une fois que nous aurons acquis la réputation et la notoriété suffisantes.

3.7 Analyse SWOT

En guise de conclusion de ce chapitre sur la stratégie, nous avons réalisé une analyse SWOT (Figure 3.7) et nous avons sélectionné quelques points qui représentaient à nos yeux les principaux éléments du projet, en interne tout d'abord, concernant nos forces (« *strengths* ») et faiblesses (« *weaknesses* »), mais aussi d'un point de vue externe, les menaces (« *threats* ») auxquelles nous nous exposons et les opportunités (« *opportunities* ») dont nous pouvions bénéficier.

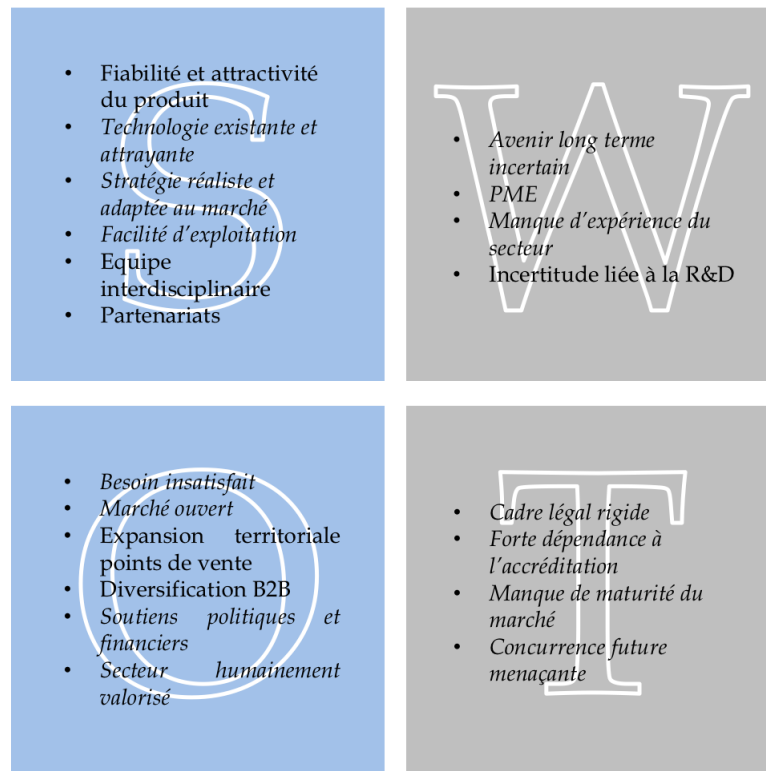


FIGURE 3.7 – Matrice d'analyse stratégique SWOT de Scancell.

3.7.1 Forces

- *Technologie existante et attrayante*

Scancell se base sur de la littérature scientifique qui a fait ses preuves, et sur un principe et une technologie connus de la communauté scientifique. Le risque lié à la validation est donc amoindri par rapport à d'autres formes de développement. De plus, les consommables et réactifs utilisés pour réaliser nos tests existent déjà sur le marché, permettant de nous assurer un approvisionnement.

De plus, les contacts obtenus avec nos futurs clients, combinés avec le cadre particulier du développement de la technologie réalisé dans les laboratoires de *Celyad*

nous font affirmer que la problématique observée en matières de détection *in vitro* des cellules tumorales est effectivement récurrente pour les entreprises de thérapie cellulaire. Notre produit Telocell, qui comble certaines lacunes actuelles, intéresse bel et bien les entreprises que nous avons interrogées [> Annexe B Etude de marché], nous laissant présager une bonne base commerciale pour l'avenir. 71% de celles-ci privilégieraient son usage en *release* et 29% en R&D.

- *Stratégie adaptée à l'environnement*

Comme nous l'avons montré précédemment [> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases], notre déploiement stratégique se fera en trois phases, chacune d'entre elles ayant des objectifs propres :

- la phase 0 (fin 2016) aura pour but de terminer le développement et la validation des tests en laboratoire ;
- la phase 1 (mi-2017) constitue la première phase de commercialisation de nos tests, sous la forme d'un service au cours duquel les échantillons cellulaires du client seront transportés vers nos laboratoires au sein desquels nous réaliserons les tests. Les objectifs de cette phase de transition sont multiples : optimiser nos tests, se conformer aux exigences du diagnostic *in vitro*, obtenir l'accréditation en tant que test de *release* auprès de l'AFMPS et réaliser les études nécessaires à la confection d'un kit de diagnostic ;
- la phase 2 (mi-2018), au cours de laquelle nous ne commercialiserons plus Telocell sous la forme d'un service, mais bien en kits de diagnostic.

Cette stratégie est le fruit d'une analyse approfondie des contraintes environnementales (technologiques et légales) liées à notre activité, mais également d'une étude de marché ayant pour but d'identifier les attentes du client (« *consumer behaviour* »). Nous avons donc construit un plan réaliste d'implantation sur le marché de la thérapie cellulaire, qui nous permet d'être rentable 16 mois après la constitution, comme nous l'expliquons dans la cinquième partie [> 5.4 Résultats et indicateurs de performance]. En cela, notre stratégie constitue une réelle force.

- *Facilité d'exploitation*

Une fois lancé, le projet requiert peu de main d'œuvre pour la gestion de l'activité. En effet, suite à notre volonté de diminuer les coûts fixes liés à notre activité, une grande partie de la production sera externalisée, tant en première qu'en deuxième phase de commercialisation. Plus précisément, nous sous-traiterons le transport des échantillons cellulaires en phase 1, alors que presque l'entièreté de la chaîne de production sera externalisée en phase 2 – à ce moment, nous serons uniquement chargés de la gestion de la fonctionnalité « personnalisation du contrôle ». Dans cette même optique, nous

établirons plusieurs partenariats clés – parmi lesquels, le partage des laboratoires de production avec une CRO existante - permettant ainsi d’alléger notre structure organisationnelle.

Ceci nous permettra de nous concentrer sur la recherche et le développement, vecteurs de réussite sur le long terme.

En outre, la forme finale de produit choisie, c’est-à-dire le kit, facilitera l’exploitation commerciale au-delà des frontières belges puisqu’atteindre un client supplémentaire ne nous demandera alors que peu d’ajustements opérationnels.

3.7.2 Faiblesses

- *Avenir long terme incertain*

Le secteur dans lequel nous nous inscrivons étant particulièrement innovant, nous savons que les alternatives technologiques de Telocell parviendront tôt ou tard à supplanter le produit, l’inconnue restant l’horizon temporel. Nous savons donc aussi qu’il sera nécessaire pour nous de continuer à innover afin de maintenir une pérennité sur le long terme. Pour cette raison, nous investirons massivement en R&D (pour laquelle nous prévoyons d’avoir nos propres laboratoires), qui deviendra le pôle central de notre entreprise à partir de la phase 2.

- *Faiblesse des PME technologiques*

La longueur des phases de développement est généralement un frein pour les petites structures. Un capital initial d’investissement est nécessaire pour tenir plusieurs années sans revenus, ne laissant qu’une très faible marge de manœuvre pour les entreprises nouvellement créées.

Par contre, les grosses structures ont, elles, la possibilité matérielle d’investir dans ces nouvelles technologies, en pariant sur les revenus futurs qu’elles en tireront, sans devoir se préoccuper du *cash-flow* quotidien qui en découle. Cela leur donne évidemment un pouvoir très confortable, qui se ressent dans les relations des différents acteurs de la thérapie cellulaire. En effet, au vu de la complexité de la reconnaissance légale des procédures médicales, plusieurs de nos interviews ont révélé que nos clients avaient tendance à préférer travailler avec des acteurs de taille importante, qui présentaient davantage de probabilité de pérennité à moyen terme (notamment Philippe Van Der Hofstadt de *B&C Group*). Cependant, il serait difficile d’envisager qu’un acteur de la thérapie cellulaire n’accepte pas notre produit uniquement parce que *Scancell* est une

PME, surtout au vu des réels apports – tant d'un point de vue de la fiabilité que de l'attractivité commerciale - de nos tests par rapport à la concurrence.

- *Peu d'expérience du secteur*

Une de nos faiblesses est liée à l'équipe mise en place à la création de l'entreprise. Elle sera en effet composée de jeunes éléments, les porteurs de projet, qui n'ont pas d'expérience spécifique dans le milieu des biotechnologies, malgré différents stages réalisés dans le secteur. Cet aspect devrait néanmoins être comblé après un peu plus d'un an d'exercice, par le recrutement d'un CEO expérimenté, ainsi que par l'expertise apportée par un *Business Angel*.

3.7.3 Menaces

- *Un cadre réglementaire rigide et fastidieux*

Une première menace à laquelle nous devons faire face est le cadre particulièrement strict mis en place par les différentes autorités, tant européennes que nationales, de contrôle de la sécurité médicamenteuse.

Ces procédures sont bien évidemment compréhensibles, puisqu'avoir une population jouissant du meilleur état de santé possible doit rester l'objectif d'une politique globale de soins de santé. Il n'est effectivement pas question d'injecter un médicament nouveau sans avoir aucune idée d'éventuelles conséquences et effets secondaires sur le corps humain.

Dans la pratique, cela implique pour nous des délais procéduriers assez conséquents. Plusieurs années s'écoulent entre le développement d'un médicament en laboratoire, jusqu'à sa commercialisation, en passant par différentes phases d'essais permettant de tester ses caractéristiques spécifiques, et donc son innocuité pour le patient final.

Dans le cadre de l'accréditation, et donc de la reconnaissance de nos tests comme élément de *release*, nous devons donc nous attendre à de longues discussions, couplées à un temps d'attente important, avant de pouvoir valider notre technologie. Cela pourrait également refroidir les ardeurs d'éventuels investisseurs, puisque les projets de thérapie cellulaire sont typiquement des projets de longue haleine. Notre stratégie en trois phases, à la fois prudente et réaliste, nous permettra de minimiser le risque lié à la rigidité de ce cadre légal.

- *Une forte dépendance à l'accréditation légale*

Pour pallier la faiblesse intrinsèquement liée à notre taille de PME, il est important que nous puissions développer d'autres avantages concurrentiels. Les aspects financier et temporel de notre offre nous placent en bonne position par rapport à nos concurrents. Cependant, bien que l'efficacité de nos tests soit scientifiquement prouvée, plusieurs développements en laboratoire sont encore nécessaires et il nous faut obtenir une accréditation légale par l'AFMPS, qui avaliserait l'utilisation de notre produit comme référence de test de *release*. Sans cet argument, les entreprises n'auraient qu'un intérêt idéologique et éthique à employer notre produit.

Concrètement, ne pas détecter à 100% les cellules tumorales d'un échantillon qu'on réinjecte chez le patient peut sembler à certains une faute déontologique. Dans la pratique, la situation est plus complexe, puisque certains patients traités par la thérapie cellulaire sont gravement malades et ont, dans de nombreux cas, une espérance de vie très réduite. Risquer potentiellement le développement d'une tumeur d'ici une décennie apparaît dans cette optique comme « *un moindre mal pour celui à qui ça peut donner la chance de voir le soleil se lever durant quelques années supplémentaires* », comme le décrivait Serge Pampfer lors d'une rencontre au forum *Mind & Market*.

Une accréditation de nos procédés donnerait au contraire aux acteurs de la thérapie cellulaire un outil de plus pour améliorer la santé de leurs patients tout en satisfaisant leurs contraintes matérielles et financières.

Deux évolutions stratégiques ayant pour but de diminuer le risque lié à l'implantation dans un marché de niche tel que celui de la thérapie cellulaire sont prévues pour l'entreprise à moyen terme, c'est-à-dire à l'horizon 2020 : une expansion territoriale dans les pays d'Europe les plus accueillants au niveau législatif et une ouverture à d'autres secteurs comme celui des médicaments anti-cancéreux. Si, à l'issue de la phase 1, Telocell n'est pas accrédité en tant que test de *release*, nous pourrions compenser une éventuelle diminution du volume de nos tests par une accélération de ces deux processus évolutifs qui pourront alors être initiés dès l'entrée en phase 2, au milieu de l'année 2018.

- *Manque de maturité du marché*

Aujourd'hui, le marché de la thérapie cellulaire est relativement petit. Peu d'entreprises se sont déployées sur le marché, et seul un produit développé en Belgique a été commercialisé.

Ce faible nombre de clients implique que nous n'avons, dans un premier temps, pas le droit à l'erreur dans nos négociations avec ces acteurs si nous voulons espérer

dégager des revenus rapidement. Convaincre le client du bien-fondé de notre produit apparaît encore une fois comme indispensable.

Un second risque, au sujet du marché belge, est le risque d'expatriation des entreprises les plus ambitieuses et à succès. La Belgique est fréquemment critiquée en raison de la difficulté qu'il y a pour les entreprises montantes de passer à une étape supérieure en trouvant un financement en adéquation avec leur besoin. Bon nombre de celles-ci décident alors d'aller s'installer aux Etats-Unis, notamment pour trouver le financement et l'expertise nécessaires à l'expansion de leur entreprise, ou encore de céder l'exploitation du produit à un partenaire pour se concentrer sur la recherche (c'est l'exemple du *Chondroselect* de Tigenix, cédé au Suédois *Sobi*). La fuite de ces talents pourrait déstabiliser entièrement le marché belge de la thérapie cellulaire et potentiellement compromettre l'avenir de nombreuses jeunes entreprises du secteur.

Une fois encore, l'expansion territoriale et l'élargissement du secteur client à long terme nous permettront de faire face à cette menace.

- *Concurrence menaçante à venir*

Ce secteur prometteur bénéficie actuellement d'un créneau concernant la compétition de marché. Peu de concurrents directs sont implantés et peu de substituts existent actuellement.

Concernant ces derniers, il faut néanmoins s'attendre à de rapides progrès technologiques qui verraient l'apparition de tests de *release* « nouvelle génération » (méthodes « *high throughput* » citées lors de l'analyse du positionnement concurrentiel), comme il a été évoqué lors de certains entretiens réalisés avec nos futurs clients. La rapidité de pénétration du marché sera donc un facteur clé puisque de nouveaux produits concurrents qui se développent en parallèle pourraient restreindre rapidement notre part de marché.

De nouveaux entrants viendront certainement s'ajouter à la liste des dangers dont il faut se méfier. *Quality Assistance* par exemple, nous a déclaré lors d'un entretien, être en observation sur le marché de la thérapie cellulaire afin de déterminer le meilleur moyen de coupler leur offre au marché. Ils ne sont certainement pas les seuls à le faire et les grandes entreprises pharmaceutiques mondiales ont toutes un laboratoire de recherche et développement sur des produits semblables afin de se diversifier en cas de succès de ce nouveau type de thérapie. Une stratégie nous permettant une pénétration rapide et efficace du marché sera donc nécessaire, d'où l'intérêt de présenter rapidement un produit au marché au travers d'un service.

3.7.4 Opportunités

Ces menaces, si elles sont bien réelles, ne doivent néanmoins pas nous faire oublier les multiples facteurs de réussite qui mèneront au succès de l'entreprise.

- *Un besoin scientifique insatisfait*

Ce premier élément majeur est la base-même de notre démarche entrepreneuriale : aujourd'hui, et depuis plusieurs années, des scientifiques belges et européens ne peuvent pas s'assurer de manière efficace et réaliste de la sécurité des échantillons de cellules qu'ils utilisent pour guérir des patients. Cette opportunité, définie par *Celyad* via le stage de Charlotte Bertrand, s'applique à d'autres parties prenantes de la thérapie cellulaire : les entreprises et les hôpitaux qui souhaitent évidemment proposer le meilleur produit possible à leurs clients. Mais aussi d'autres secteurs, notamment en développement de médicaments, pour qui des tests d'évaluation *in vitro* de la tumorigénicité efficaces, rapides et peu chers représenteraient des possibilités de développement énormes.

Les solutions en vigueur actuellement, bien que reconnues par les agences nationales et supranationales médicamenteuses, ne font pas l'unanimité auprès de la communauté scientifique, de par leur manque de fiabilité et/ou d'attractivité, une alternative est donc nécessaire : Telocell.

- *Marché ouvert*

Pour l'instant, cette alternative se trouve quelque peu esseulée dans le panel de services et produits mis à la disposition de la thérapie cellulaire. Le marché est en effet peu encombré et laisse la place à de nouveaux entrants qui bénéficieront de l'engouement généralisé du secteur des biotechnologies en Belgique qui se concentre sur plusieurs pôles majeurs.

Le cycle de vie d'un produit de thérapie cellulaire, entre la recherche fondamentale et la guérison d'un patient, est long et coûteux. De plus, les étapes successives du développement correspondent souvent à des compétences très différentes. De la recherche à la vente, en passant par les essais cliniques, les accréditations légales ou encore la logistique de production, il y a là un processus complet qui ne peut pas facilement être maîtrisé par une seule entreprise qui contrôlerait l'entièreté de la chaîne de la valeur. On constate donc une grande volonté d'externalisation parmi les entreprises de la thérapie cellulaire, pour qui ce n'est simplement pas le *core business* que de développer des méthodes analytiques.

Il y a peu de concurrence donc qui ralentirait et empêcherait notre développement et il y a de la place pour de nouveaux entrants qui souhaiteraient combler d'autres besoins actuellement inexploités.

- *Volonté politique de soutenir les biotechnologies*

De manière générale, le secteur des biotechnologies a la cote auprès de nos politiques. D'importants budgets, notamment au travers du Plan Marshall 4.0, ont été débloqués pour proposer un financement alternatif à des entreprises qui innoveraient dans ce secteur. Historiquement, les pouvoirs publics ont effectué près de 20% des investissements réalisés dans les entreprises belges de thérapie cellulaire, et l'apport investi devrait encore augmenter dans les années à venir.

Des organisations ont également été mises en place dans l'unique but de soutenir et centraliser ces secteurs à forte croissance. Pour les soins de santé, *Biowin* est l'acteur de référence pour les différentes parties prenantes de ce pôle de compétitivité.

- *Un secteur humainement valorisé*

Finalement, le secteur dans lequel s'inscrit cette démarche est important car il ne s'agit pas de vendre à tout prix un produit banal pour concurrencer son voisin. La thérapie cellulaire s'inscrit dans une vraie démarche idéologique de protection d'autrui et de préoccupation réelle pour l'humain.

Les traitements qui sont actuellement développés permettront demain de guérir les maladies auxquelles nous avons tous été directement ou indirectement confrontés. Les complications cardiovasculaires, le diabète ou encore les cancers ; tant de maux qui touchent aujourd'hui et toucheront demain encore des centaines de millions de personnes à travers le monde, dont certainement, l'un de nos proches.

Investir du temps et des moyens dans un secteur qui peut avoir un réel impact pour l'avenir de l'être humain est, sans aucun doute, une motivation pour tous les acteurs qui composent le secteur. Motivation qu'il est bon de garder à l'esprit à l'aube du lancement d'une nouvelle entreprise.

Analyse opérationnelle

4.1	Logistique	123
4.1.1	Production	123
4.1.1.1	Phase 1	124
4.1.1.2	Phase 2	128
4.1.1.3	Création d'une banque de lignées cellulaires tumorales	128
4.1.2	Transport	133
4.1.3	Approvisionnement	133
4.2	Infrastructures	135
4.2.1	Laboratoires	135
4.2.1.1	Fonctions des laboratoires	135
4.2.1.2	Normes à respecter	136
4.2.1.3	Equipements de laboratoire	138
4.2.2	Entrepôt	138
4.2.3	Bureaux	139
4.3	Recherche et développement	140
4.3.1	Phase 0	140
4.3.2	Phase 1	142
4.3.3	Phase 2	143
4.4	Protection de l'innovation	144
4.4.1	Innovation en entreprise	144
4.4.2	Brevet	146
4.4.2.1	Notion de brevet	146
4.4.2.2	Conditions classiques de brevetabilité	147
4.4.3	Secret d'affaires	152
4.4.3.1	La directive du 14 avril 2016	152

4.4.3.2	Protection par le droit pénal	153
4.4.3.3	Protection prévue par le droit du travail	154
4.4.3.4	Protection par concurrence déloyale et article 1382 du Code civil	155
4.4.3.5	Protection grâce au droit des contrats	156
4.4.3.6	Mesures pratiques pour la protection du secret	157
4.4.4	Choix final : secret ou brevet ?	157
4.5	Autres protections juridiques	160
4.5.1	Exploitation du produit développé chez <i>Celyad</i>	160
4.5.1.1	Hypothèse 1 : le produit est breveté par <i>Celyad</i>	160
4.5.1.2	Hypothèse 2 : <i>Celyad</i> garde le produit sous forme de savoir-faire	163
4.5.2	Protection de l'identité de <i>Scancell</i>	164
4.5.2.1	Dénomination sociale et nom commercial	164
4.5.2.2	Marque	165
4.6	Gestion des relations commerciales	167
4.6.1	Marketing	167
4.6.1.1	Marketing en B2B.	167
4.6.2	Relations contractuelles avec les tiers	172
4.6.2.1	Confidentialité	172
4.6.2.2	Non-concurrence	174
4.6.2.3	Contrats clients et fournisseurs.	175
4.7	Gestion administrative.	177
4.7.1	Structure organisationnelle.	177
4.7.1.1	Un contrat	177
4.7.1.2	Un partenariat	178
4.7.1.3	Un capital.	178
4.7.1.4	Titres	178
4.7.2	Administration et gestion.	178
4.7.2.1	Administrateur délégué	179
4.7.2.2	Conseil d'administration	179
4.7.2.3	Agrandissement de l'équipe	180
4.7.2.4	Rémunération.	180
4.7.2.5	Culture de l'entreprise	181

4.1 Logistique

La logistique peut entraîner des modifications profondes de la structure de coûts et du rendement d'une entreprise, en fonction de l'approche stratégique et globale (Mathe & Tixier 2005).

Une partie de notre stratégie financière consiste à réduire au maximum les frais fixes, dans le but d'être rapidement opérationnels sans investissements externes trop importants. Cela passe notamment par l'externalisation de plusieurs compétences pour lesquelles nous profiterons de l'expérience de nos futurs partenaires.

Pour ces raisons, nous avons opté pour une logistique principalement décentralisée. La production des kits se fera par une entreprise spécialisée, ainsi que le transport, qui sera lui aussi externalisé, et ce, quelle que soit la phase stratégique dans laquelle nous nous trouvons.

Nous maintiendrons par contre en notre sein les compétences clés d'analyse des échantillons comme service, et la recherche et développement de nos produits.

4.1.1 Production

A la base de tout processus de production figurent l'ensemble des ressources intervenant dans ce procédé qu'elles soient matérielles (consommables premiers ou intermédiaires, équipements, locaux) ou immatérielles (main d'œuvre). Ainsi, la production industrielle consiste à transformer ces facteurs de production en nouveaux produits et/ou services. Mais la production peut également être définie comme l'activité économique qui apporte de la valeur ajoutée à une entreprise. Notre objectif est d'apporter sur le marché un service/produit fini dont le prix est supérieur à nos coûts de production, nous inscrivant ici dans le cadre de la définition d'une production marchande (Federal Reserve Bank of St Louis n.d.).

Dans ce cadre, la production de la future entreprise *Scancell* adoptera une double stratégie de commercialisation [> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases]. Ainsi, durant la première phase, les tests du package Telocell seront proposés sous la forme d'un service : la réalisation des tests dans nos laboratoires. Dix-huit mois après la constitution de l'entreprise, nous prévoyons de débiter la commercialisation de Telocell en kits. A ce moment, la production sera centrée sur la confection de cet assemblage.

L'organisation de la production tout au long de ces deux phases, ainsi que les filières industrielles qui y sont liées, sont présentées à la figure ci-dessous.

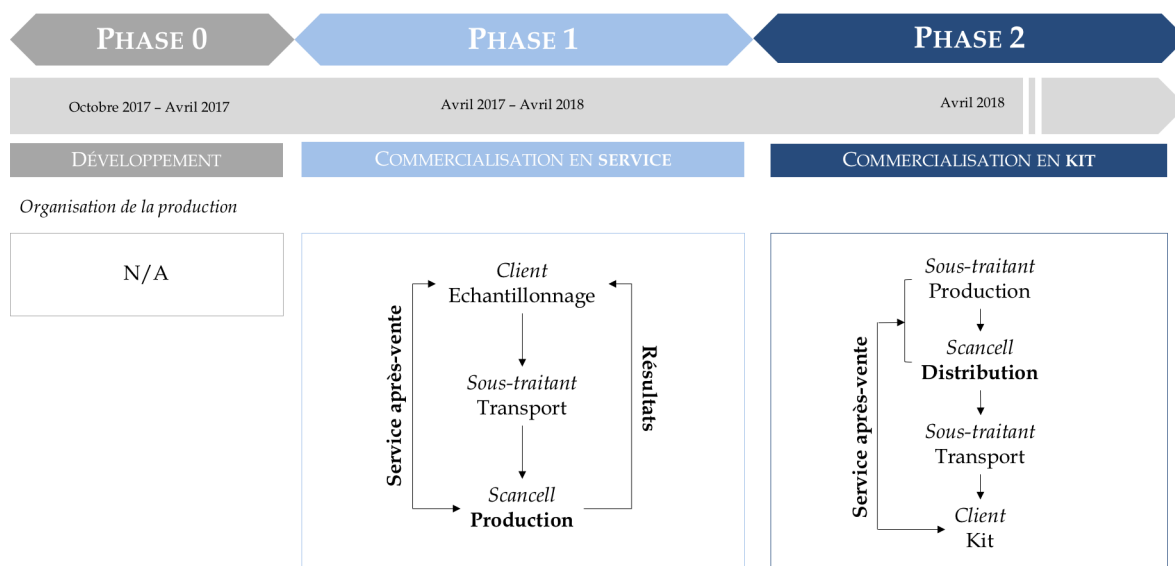


FIGURE 4.1 – Organisation de la production et filières industrielles.

4.1.1.1 Phase 1

La production réalisée durant la première phase stratégique aboutira à la proposition d'un service complet, dont nous prendrons en charge toutes les étapes, de l'échantillonnage du produit de thérapie cellulaire de nos clients jusqu'au suivi de satisfaction. La filière industrielle de cette phase, comprenant les étapes de production ainsi que les acteurs impliqués à chaque étape, est reprise dans la Figure 4.1. En tant que future CTOO (*Chief Technology and Operating Officer*) de l'entreprise *Scancell*, Charlotte Bertrand sera chargée d'assurer du bon déroulement de l'ensemble de ces étapes.

- *Echantillonnage*

L'échantillonnage par nos clients est l'étape préliminaire en phase 1, elle consiste à prélever un échantillon représentatif du produit fini de thérapie cellulaire. C'est une procédure classique en thérapie cellulaire, indispensable à la réalisation des différents tests de *release*, (analyses réalisées sur plusieurs fronts) qui vise à déterminer si un lot de thérapie cellulaire peut être injecté ou non. Ces procédures sont bien établies et propres à chaque entreprise de thérapie cellulaire, nous n'interviendrons pas dans ce processus.

Une fois le prélèvement effectué par notre client, des manipulations supplémentaires devront être réalisées sur les échantillons cellulaires. En effet, les tests du package Telocell doivent être réalisés à partir d'un culot de cellules, c'est-à-dire d'un amas de cellules agglomérées au fond d'un tube. Pour optimiser l'échantillon, nous prévoyons d'envoyer à destination du client un fascicule détaillé, contenant toutes les explications nécessaires à l'obtention de ce culot de cellules (procédure, nombre de cellules à échantillonner, etc.). Le fait que nos tests puissent être réalisés à partir d'un culot de cellules représente

un autre avantage compétitif par rapport à certaines méthodes substitués actuellement disponibles telles que le caryotype ou le Soft agar. En effet, ces dernières doivent être réalisées à partir de cellules en culture, dont le transport est beaucoup plus délicat que celui des culots cellulaires.

- *Transport des échantillons*

Une fois prélevés, les échantillons de culots cellulaires doivent être transférés dans nos laboratoires, où ils seront soumis aux tests du package Telocell. L'étape de transport des échantillons cellulaires sera sous-traitée à une entreprise de logistique spécialisée dans la biotechnologie. Les détails de ce partenariat, ainsi que les conditions de transport des échantillons de culots cellulaires, seront expliqués dans la section spécifique au transport ci-après.

- *Production*

La troisième étape du service « tout-compris » que nous proposerons en première phase stratégique est la production en tant que telle. Autrement dit, il s'agit du moment où les tests sont réalisés dans nos laboratoires par un de nos scientifiques, selon un protocole défini. Pour permettre cette production, les matières premières et produits intermédiaires nécessaires à l'analyse des échantillons cellulaires doivent être acheminés dans nos locaux ; cette organisation fait partie de la gestion des approvisionnements de notre entreprise, qui sera détaillée dans la section approvisionnement ci-après. Le *flow chart* de la production de Telocell est représenté à la Figure 4.2. Il s'agit d'un outil organisationnel représentant la séquence des actions et des décisions en jeu dans la réalisation de nos tests en laboratoire.

Nous avons estimé qu'un maximum de vingt-cinq lots cellulaires pouvaient être analysés simultanément pour chaque test du package, en disposant d'une seule machine de qPCR. Pour cette quantité d'échantillons, l'extraction du matériel nucléaire (ADN génomique et ARN) à partir duquel nos tests sont réalisés, prendrait environ 3 heures suivies de la réalisation de chacun des trois tests de notre package ce qui nous permettrait donc d'obtenir les résultats globaux au terme de 12 heures de travail en laboratoire. Ceci correspond grosso modo à une journée et demi de travail à temps plein. En résumé, notre capacité maximale de production est de 25 échantillons en 12 heures, ce qui revient à une vitesse de production de 2,1 lots/heure. Cette vitesse pourra évidemment être augmentée, si un nombre inférieur d'échantillons doivent être analysés - la durée de chaque étape du *flow chart* serait alors plus faible - ou si nous disposons de plus de machines de qPCR.

Charlotte Bertrand, en tant qu'unique équivalent temps plein (ETP) lors de cette phase, réalisera l'ensemble des manipulations et analyses sur les échantillons de culots cellulaires. Précédemment en charge du développement et de la validation des tests du package Telocell, elle possède en effet l'expertise la plus adaptée concernant les protocoles de chaque test. Lorsque les volumes de production augmenteront (au cours de la deuxième année d'exercice), un technicien de laboratoire prendra en charge l'entièreté de la production, en appliquant les protocoles précédemment établis.

Cette phase verra naître un partenariat de partage de laboratoires avec une CRO existante, dont les avantages multiples ont été évoqués précédemment dans la troisième partie [*> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases*]. Une attention particulière sera apportée aux clauses du contrat nous liant à ce partenaire, notamment concernant l'exclusivité et la confidentialité (selon les conseils de Philippe Van Der Hofstadt, CEO de *B&C Group*), afin d'établir une relation avec ce dernier, une relation de confiance qui nous permettra de prospecter de nouveaux clients.

Une fois la production achevée, les résultats bruts seront interprétés par nos scientifiques puis envoyés au client.

- *Service après-vente*

Après l'envoi des résultats au client interviendra le service après-vente : il s'agit de s'enquérir du degré de satisfaction du client quant aux étapes de la production de *Scancell* qui lui sont visibles : l'échantillonnage et la réalisation des tests en laboratoire. Tout d'abord, en ce qui concerne l'échantillonnage, nous cherchons à obtenir l'avis du client par rapport à la facilité de compréhension du fascicule d'échantillonnage, et plus crucialement, sur la production en tant que telle. C'est en effet ce dialogue qui nous permettra d'assurer deux des objectifs de la première phase stratégique : optimiser les tests et générer des résultats pour consolider notre dossier d'accréditation en tant que tests de *release*. Pour cela, nous devons faire preuve de transparence – une de nos valeurs fondamentales - avec nos clients, à qui nous pourrions expliquer le principe de fonctionnement des tests, tout en nous protégeant par l'établissement d'un accord de confidentialité (NDA, *Non-Disclosure Agreement*).

Un dialogue aura donc lieu entre la CTOO de notre entreprise et le département R&D de nos clients. Nos tests étant à ce stade destinés à un usage de recherche, nous chercherons à contacter au sein du département R&D de chaque entreprise de thérapie cellulaire, tant le cadre responsable de la réception des résultats générés par nos tests que le technicien de laboratoire qui a été en contact direct avec le fascicule d'échantillonnage.

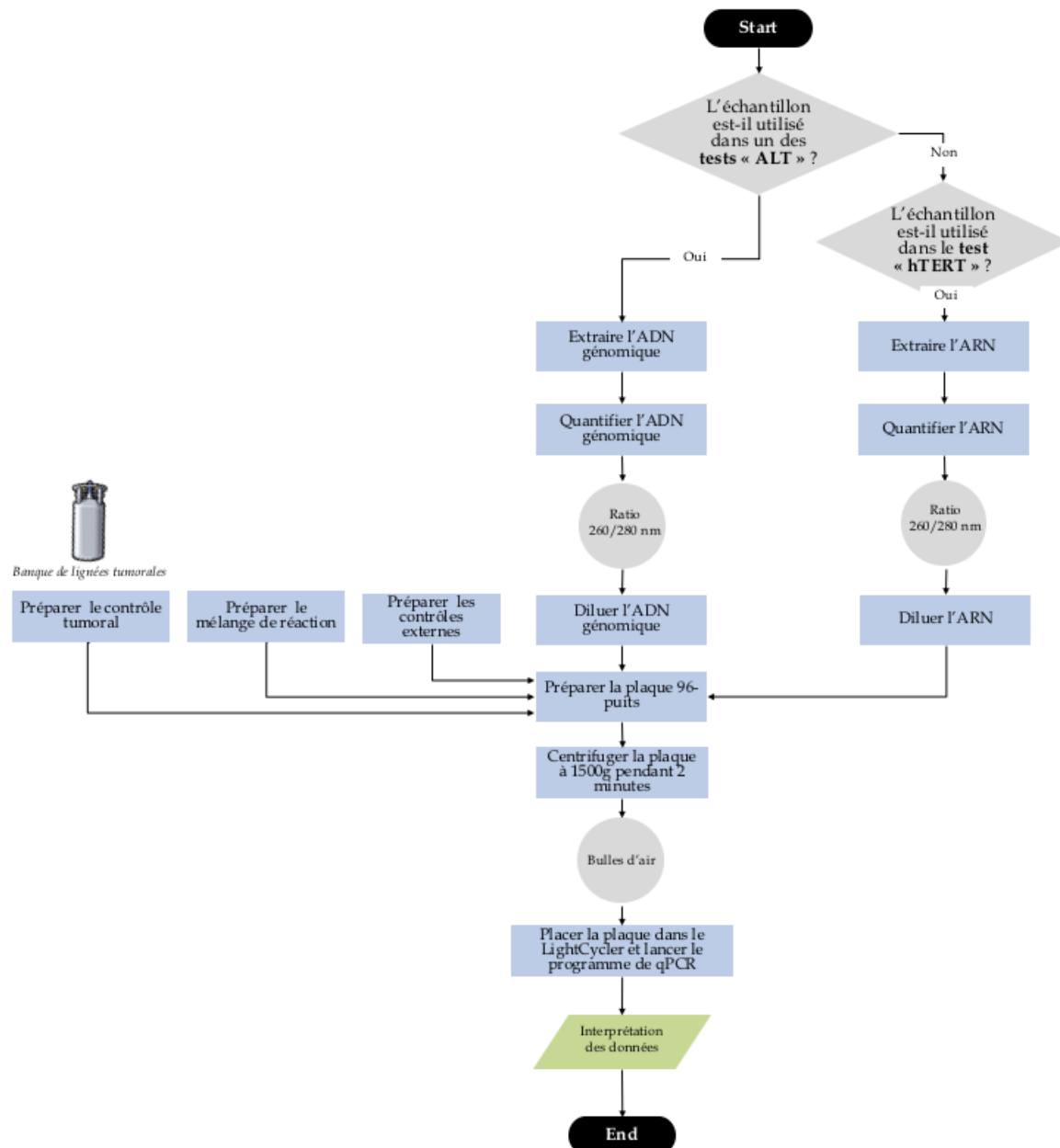


FIGURE 4.2 – Flow chart représentant la succession des étapes de la production des trois tests de telocell. Les étapes générales sont ici représentées, et sont identiques pour les deux tests d'analyse de htert (ce qui explique la présence de deux branches plutôt que trois). A chaque étape sont attribuées différentes spécifications pour chaque test.

4.1.1.2 Phase 2

La confection des kits sera sous-traitée à une entreprise spécialisée, dont les installations doivent obligatoirement répondre aux normes GQCP, comme nous l'expliquerons dans la section suivante [> 4.2 Infrastructures]. Mentionnons que, si nous obtenons l'accréditation au terme de la phase stratégique 1 – ce qui est fortement probable au vu du dossier que nous construirons pendant un an -, le kit sera alors vendu en tant que test de *release* pour l'évaluation du critère « sécurité » des échantillons de thérapie cellulaire. Nous avons choisi de sous-traiter l'ensemble des étapes de confection des kits (de la conception à la fabrication), car elles demandent une expertise très spécifique, pour laquelle le développement en interne impliquerait un coût relativement important. Une fois confectionnés, les kits seront donc transportés vers les locaux de nos clients, par une entreprise de logistique spécialisée dans la biotechnologie. De la même manière que nous avons sous-traité le transport des échantillons cellulaires en phase 1, nous sous-traitons donc également le transport des kits. Finalement, les tests seront réalisés au sein du laboratoire du client, par ses employés. Les kits Telocell permettront au client d'assurer toutes les étapes décrites dans le *flow chart* de la Figure 4.2, excepté l'extraction et la quantification du matériel nucléaire (ADN génomique, ARN), pour lesquels des assemblages existent déjà sur le marché.

Lors de cette phase, ce choix de sous-traiter une grande partie de nos activités de production nous permettra de nous concentrer sur la R&D, cruciale pour élargir notre offre.

4.1.1.3 Création d'une banque de lignées cellulaires tumorales

Comme nous l'avons expliqué dans la présentation de notre offre, si nos tests sont plus fiables que la moyenne, c'est également parce que nous fournissons un résultat cohérent et adapté à chacun de nos clients via la personnalisation du contrôle positif. Pour rappel, dans notre cas, le contrôle positif des tests de Telocell est constitué de cellules provenant d'une lignée tumorale, c'est-à-dire d'une population homogène et stable de cellules tumorales. Ces lignées peuvent provenir de cellules cancéreuses prélevées chez un patient malade, de cellules transformées naturellement suite la présence de mutations touchant des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, ou encore de cellules immortalisées artificiellement par un oncogène (Masters 2000).

La fonctionnalité "personnalisation du contrôle" permet au client de choisir la lignée tumorale et donc le type de cellules tumorales qu'il souhaite analyser comme référence du test. Cette référence fournira un résultat positif, qui sera comparé au résultat obtenu pour l'échantillon cellulaire du client. En effet, en fonction du matériel cellulaire sur lequel se base leur procédé (cellules souches mésenchymateuses, cellules progénitrices

du foie, cellules T), les occurrences de différents types de tumeurs ne sont pas identiques. Ainsi, la personnalisation du contrôle nous permettra de fournir un résultat adapté à chaque thérapie cellulaire développée par nos clients.

Pour garantir la personnalisation du contrôle, nous aurions pu envisager d'utiliser des cultures cellulaires mais celles-ci présentent une série d'inconvénients à long terme, tant sur le plan biologique (risque de contamination, dérive génétique, etc.) qu'économique – le coût du maintien des cellules en culture est relativement important (Sigma-Aldrich n.d. ; Stacey 2004). Pour ces raisons, nous avons opté pour la création d'une banque cellulaire, espace de stockage des lignées tumorales où la stabilité des cellules tumorales est assurée par leur congélation (par l'azote liquide, dont la température atteint -196°C), celles-ci étant cryopréservées dans une solution contenant de 5 à 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde). Les lignées seront achetées chez un fournisseur spécialisé (tel qu'ATCC) et soumises à la procédure décrite à la Figure 4.3, expliquant les étapes à suivre afin de créer et d'implémenter une banque cellulaire selon les bonnes pratiques. Au cours de ce processus, le contrôle qualité (QC) concernant l'analyse microbienne ainsi que l'authentification des cellules tumorales seront sous-traités. Stocker les lignées tumorales en banque présente de multiples avantages (Sigma-Aldrich n.d.) :

- Le matériel cellulaire – et donc nucléaire – reste de bonne qualité ;
- Les tests sont effectués sur des échantillons cellulaires présentant le même nombre de passages (nombre de fois que la culture a été subdivisée), ce qui permet d'obtenir des résultats comparables d'une production à l'autre ;
- Les cellules ne sont que temporairement en culture, ce qui réduit les coûts liés à la fonctionnalité "personnalisation du contrôle" ;
- Les caractéristiques originelles des cellules sont conservées, ce qui peut ne pas être le cas lorsqu'elles sont cultivées sur le long terme.

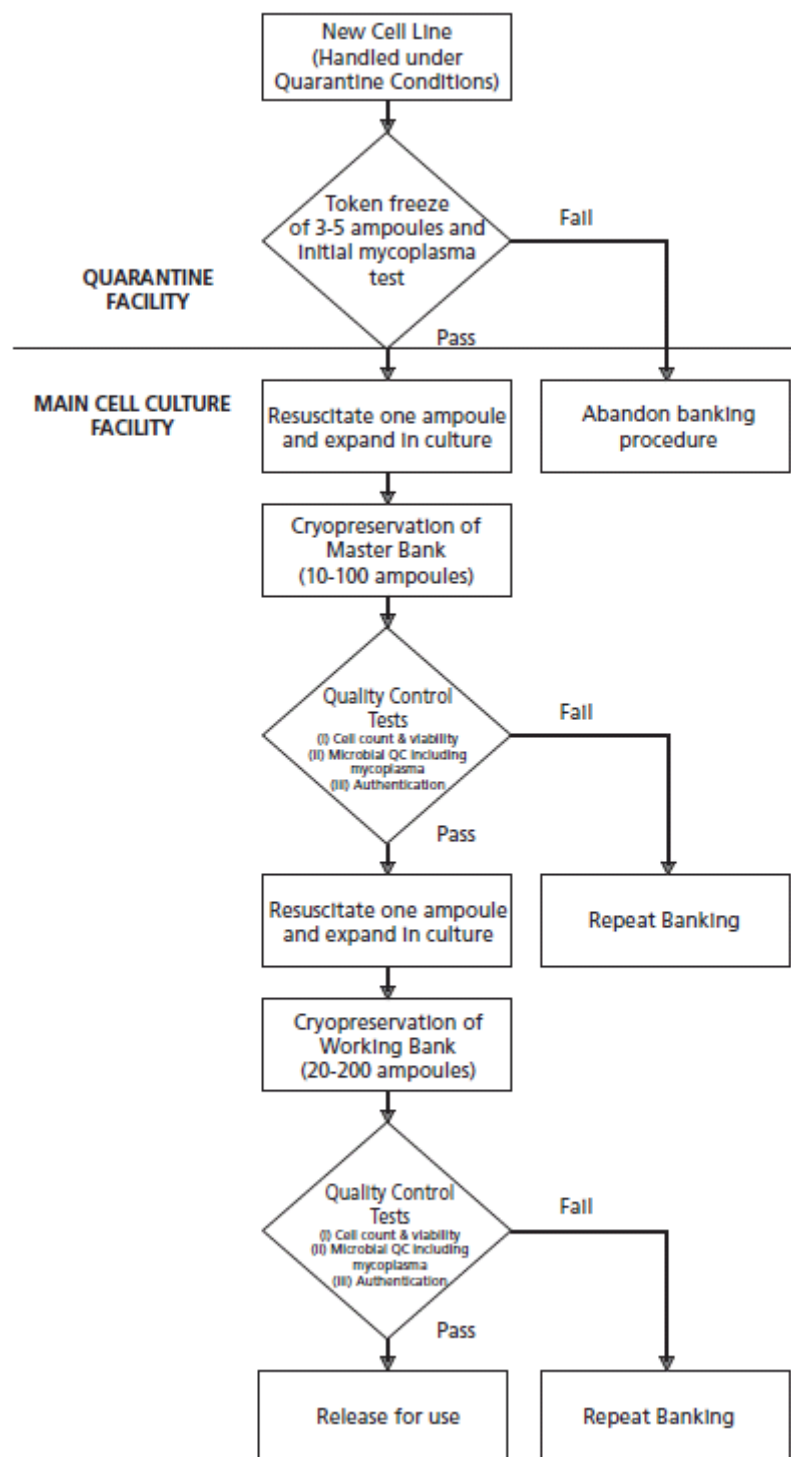


FIGURE 4.3 – Flow chart représentant les étapes nécessaires à la création et au maintien d'une banque cellulaire (Sigma-Aldrich n.d.).

En ce qui concerne les types tumoraux que nous proposerons à nos clients pour cette fonctionnalité de Telocell, nous avons sélectionné sept lignées (Tableau 4.1). Pour ce faire, nous nous sommes basés sur le matériel cellulaire qui se trouve à la base des procédés de l'ensemble des entreprises de thérapie cellulaire dont la production est gérée en Belgique. En Belgique, comme dans l'ensemble de l'Europe, les thérapies sont menées

majoritairement à base de cellules souches mésenchymateuses adultes, dont le potentiel de différenciation est relativement varié (Jackson et al. 2007) , nous pouvons en déduire que les lignées présentées dans le tableau ci-dessous seront également applicables pour notre expansion en Europe.

Ainsi, parmi les acteurs belges dont la thérapie cellulaire est autologue, on retrouve trois types de matériel cellulaire initial. Les cellules souches mésenchymateuses adultes, qu'elles proviennent de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou de tissu ombilical, sont les plus fréquentes puisqu'elles sont utilisées par 8 entreprises sur 11. Selon la littérature scientifique, les sarcomes sont les cancers qui se développent le plus fréquemment à partir de telles cellules (Eid & Garcia 2015 ; Tolar et al. 2007 ; Xiao et al. 2013). Pour ces raisons, nous avons sélectionné 5 lignées de sarcomes (ostéosarcome, fibrosarcome, chondrosarcome), certaines étant hTERT-positives, d'autres étant ALT-positives. Il est tout de même intéressant de mentionner que, selon la base de données COSMIC , les lignées tumorales ALT-positives sélectionnées ne sont pas rapportées comme possédant les mutations d'intérêt pour le test « Détection des mutations ALT » du package Telocell. Pour ce test, les plasmides contenant les mutations représentent donc les seuls contrôles pertinents. Cependant, ces lignées peuvent être utilisées en guise de contrôle du test « Mesure de la longueur des télomères ». Pour la thérapie cellulaire de *Promethera*, basée sur l'utilisation de cellules progénitrices du foie, nous avons sélectionné une lignée de carcinome hépatocellulaire, car les cellules composant ce type de cancer sont connues pour posséder des caractéristiques phénotypiques identiques aux cellules progénitrices du foie, ce qui nous pousse à croire que ces cellules en sont à l'origine (Deblandre et al. 2012). Finalement, pour les thérapies basées sur l'utilisation de lymphocytes, les cancers d'intérêt sont les leucémies et les lymphomes (Lymphoma Research Foundation n.d. ; American Cancer Society 2015).

Tableau 4.1 – Lignées tumorales choisies en fonction des thérapies cellulaires belges. BMMSC : *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells* ; AMSC : *Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells* ; HALPC : *Human Adult Liver Progenitor Cells* ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; NK : *Natural Killers* ; ND : non déterminé.

MATÉRIEL INITIAL	ENTREPRISE(S) CIBLÉE(S)	CANCER(S) D'INTÉRÊT	LIGNÉES TUMORALES	TÉLOMÉrase+ OU ALT+ ?
Cellules souches mésenchymateuses (BMMSC ; AMSC ; ombilicales)	<i>Celyad, Novadip, Bone Therapeutics, Tigenix, ReGenesys, The Cell Factory, Athersys, Gamida cell</i>	Sarcome	HT1080	Télomérase+
			MG-63	Télomérase+
			U-2 OS	ALT+
			SW684	ALT+
Cellules adultes progénitrices du foie (HALPC)	<i>Promethera</i>	Carcinome hépato- cellulaire	HepG2/C3A	Télomérase+
Lymphocytes (CD4+, CD8+, Treg, NK)	<i>Celyad, Gamida cell, Imcyse, Tx cell</i>	Leucémie	Jurkat	Télomérase+
		Lymphome	HH	ND

4.1.2 Transport

Dans la mise en œuvre de ce projet, le transport est un élément important à prendre en compte : pour rappel, en phase 1, il s'agit du transport des échantillons de cellules depuis le client vers nos laboratoires afin qu'ils soient analysés, tandis qu'en phase 2, le transport consiste à faire parvenir les kits Telocell à nos clients. Dans les deux cas, nous ferons appel à une société spécialisée pour réaliser ces activités.

En effet, le transport des cellules, contenues dans des ampoules cryogéniques stériles, est un processus assez exigeant car les échantillons de nos clients doivent rester dans des conditions de conservation spécifiques pour pouvoir être analysés au mieux. En effet, les lots se conservent à une température proche de -80°C , qui conserve les cellules en dessous du seuil de -70°C , au-dessus duquel les ribonucléases sont considérées comme actives et détériorent la qualité des échantillons (Haute Autorité de Santé 2009). Cette température de conservation de -80°C est atteinte grâce à de la glace carbonique (CO_2 sous forme solide), qui fournira les conditions nécessaires au stockage des cellules pendant environ 5 jours (de 5 à 20% d'évaporation par jour, en fonction de la pression atmosphérique). Afin de limiter l'évaporation de la glace carbonique suite à l'exposition directe à une température ambiante trop élevée, celle-ci pourra être isolée par exemple avec du polystyrène.

L'avantage de ce type d'emballage est qu'il n'est pas nécessaire de posséder un véhicule frigorifié pour le transport. Ce contenant est évidemment fourni par l'entreprise de transport, qui gère son processus depuis le client jusqu'à nos laboratoires. Une fois dans nos laboratoires, les échantillons cellulaires seront conservés jusqu'à leur analyse, dans un réfrigérateur à -80°C .

La dimension irrégulière du transport des échantillons en phase 1, ainsi que son rôle crucial dans notre chaîne logistique, rendent indispensable ce partenariat avec une société de transport adaptée. Pour cela, nous avons eu des contacts privilégiés avec Philippe Van Der Hofstadt, CEO de *B&C Group*, une société belge spécialisée dans la résolution de problèmes logistiques pour les entreprises de biotechnologies (B&C Group 2016).

4.1.3 Approvisionnement

Une analyse des approvisionnements doit aborder tant les flux physiques, les matières premières - dans notre cas, des kits contenant les consommables nécessaires à nos tests et à la R&D - que les flux administratifs, qui gèrent l'information liée à ces flux physiques, c'est-à-dire les factures, les ordres de commandes, etc (Ritzman & Krajewski 2010).

Comme nous l'avons souligné précédemment dans les parties sur l'opportunité et la stratégie, l'entreprise *Roche* sera un de nos fournisseurs privilégiés pour les éléments à intégrer au Telocell, le détail de ces derniers se trouvant [> Annexes financières]. En effet, nous avons développé nos procédés avec leurs produits, et donc, un changement de fournisseur impliquerait un temps de recherche supplémentaire pour valider à nouveau nos tests. Il sera évidemment indispensable de développer avec *Roche* une relation solide, basée sur un contrat les engageant sur plusieurs années, dans la continuité des premiers contacts cordiaux que nous avons eus pour le devis de machines précises. Les autres fournisseurs de consommables seraient par contre substituables l'un à l'autre, et n'exigeraient pas de changement de procédures.

Concernant le flux administratif, il sera centralisé par Robin Pétré, qui gèrera le système prévisionnel des commandes, étroitement lié à la gestion financière quotidienne de l'entreprise - *Roche* demandant un paiement dans les 30 jours après l'émission de la facture (Roche 2016). Un système de vérification de la commande effectivement reçue sera également mis en place pour s'assurer du contenu reçu, et ce, tant en interne que via le producteur de nos kits.

Les autres approvisionnements d'équipements quotidiens, les fournitures de bureaux par exemple, se feront via des sociétés spécialisées en ligne, sans recherche particulière (telles que *Viking* ou *Bruneau*).

4.2 Infrastructures

Tout comme nous avons opté pour une logistique principalement décentralisée, nous avons décidé dans une optique de limitation des coûts initiaux de privilégier la location de nos différents bâtiments, laboratoires, bureaux et entrepôts.

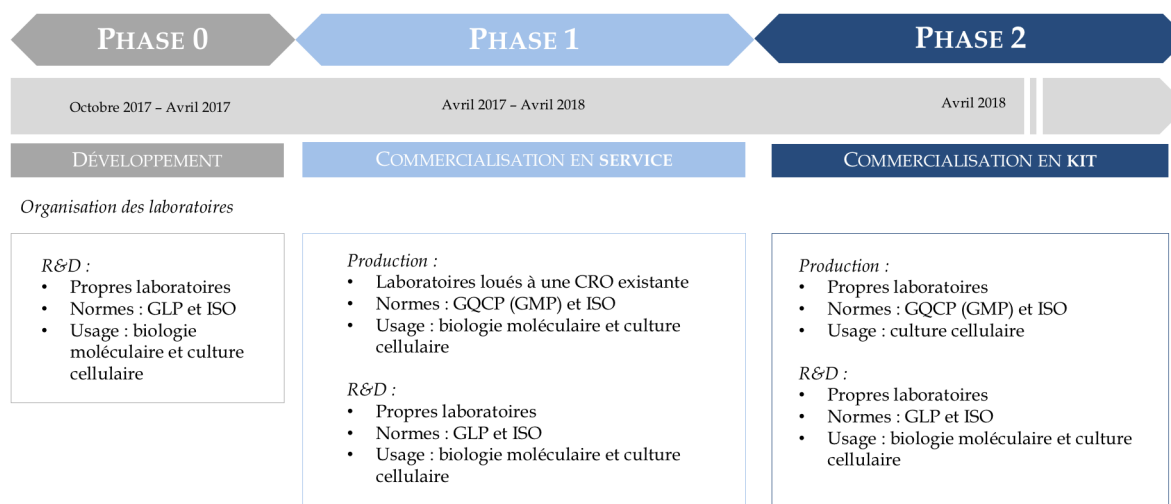


FIGURE 4.4 – Organisation des laboratoires au cours des différentes phases stratégiques

4.2.1 Laboratoires

4.2.1.1 Fonctions des laboratoires

Les laboratoires que nous utiliserons auront une double fonction, et une double localisation.

D'une part, dès la création de l'entreprise, nous aurons nos propres laboratoires de recherche et de développement, dans le but d'une constante amélioration de nos procédés et de la validation de nouveaux produits. Ceux-ci seront constitués d'une pièce de culture cellulaire, et d'une autre destinée aux analyses moléculaires.

D'autre part, en phase stratégique 2, nos laboratoires seront aménagés pour assurer une partie de la production (personnalisation du contrôle). Dans ce cadre, ils devront contenir une autre pièce de culture cellulaire respectant certains référentiels de qualité (GMP), ainsi que d'une pièce « azote », contenant notre banque de lignées tumorales que nous rajouterons dans les kits pour nos clients.

Nous avons également décidé de nous associer avec une CRO déjà existante dans le cadre de la réalisation du service en phase 1, et d'établir un partenariat nous permettant d'utiliser leurs laboratoires. Cette solution permettra à la CRO de rentabiliser l'espace actuellement inoccupé, et nous évitera de financer les investissements requis pour ce

type d'installation (gagnant-gagnant), causés notamment par le respect des référentiels de qualité GMP que nous développons dans le point suivant.

4.2.1.2 Normes à respecter

- *Normes GMP*

Un critère indispensable dans le choix de la CRO partenaire est la certification de ses laboratoires, c'est-à-dire l'ensemble des normes établies qui doivent absolument y être respectées.

Dans le cadre de la proposition de nos tests sous la forme d'un service à la thérapie cellulaire, nous souhaitons disposer de laboratoires certifiés GQCP (pour « *good quality control practices* »). Cette certification fait partie du référentiel GMP (pour « *good manufacturing practices* »), intrinsèquement lié à la production (bio)pharmaceutique, au sein de laquelle figure la production de thérapies cellulaires. Ces normes internationales sont créées par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) (WHO 2009, p. 7). Ainsi, pour la production de leurs lots destinés à l'injection, toutes les entreprises de thérapie cellulaire doivent suivre les normes dictées par le système GMP, qui assure qu'un produit est fabriqué en respectant des standards de qualité. Plus précisément, ce système d'assurance qualité permet de minimiser les risques liés à la production de tout produit pharmaceutique tels que les erreurs humaines, les contaminations ou les consommables de mauvaise qualité. Les bonnes pratiques de production couvrent, via des procédures écrites qui doivent être appliquées à la lettre, tous les aspects de ce processus qui pourraient avoir un impact sur la qualité du produit fini, que ce soit au niveau des matières premières, des locaux de production, ou encore des équipements utilisés. Une structure organisationnelle doit pouvoir fournir la preuve documentée que ces procédures ont été respectées à chaque étape de la production (ISPE n.d. ; U.S. Food and Drug Administration 2015).

Les normes GMP ont été reprises au niveau européen à travers une directive de 2003 (Directive 2003/94/CE). Les inspections sont faites au niveau national, par les autorités de santé de chaque état ; en Belgique, c'est donc l'AFMPS. Le système GQCP, quant à lui, concerne le contrôle qualité des produits (bio)pharmaceutiques et comprend globalement les mêmes règles et procédures que le référentiel GMP (van Zyl 2006). Dans le cas du secteur de la thérapie cellulaire, les tests de *release* doivent par exemple être réalisés dans des conditions GQCP, afin de garantir la fiabilité du résultat obtenu. Bien que l'adoption de ce référentiel ne soit pas indispensable au projet *Scancell* lors de la première phase stratégique – étant donné que le package Telocell ne sera à ce moment pas encore accrédité en test de *release* –, nous l'estimons importante pour la création d'une relation de confiance et pour augmenter notre crédibilité auprès du client.

- *Normes ISO*

Les laboratoires que nous occuperons devront également répondre aux normes ISO 15189 et ISO 17025, spécifiant plus globalement les exigences de qualité et de compétence propres aux laboratoires analytiques en biologie médicale (ISO 2005 ; ISO 2012).

- *Normes GLP*

En ce qui concerne les laboratoires de R&D, nous avons choisi de les faire certifier GLP (pour « *good laboratory practices* »). Ces normes internationales sont créées par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (WHO 2009, p. 7). Pour se conformer aux exigences GLP, il faut les respecter à tout point de vue et à chaque étape des recherches menées en laboratoire (WHO 2009, p. 8). Les normes GLP permettent de mettre en place et standardiser toutes les étapes et processus utilisés au sein d'une entreprise faisant de la recherche (WHO 2009, p. 10). Dans le cadre de cet exposé, nous allons nous limiter à citer les cinq points fondamentaux mis en avant à travers les GLP : (i) ressources : organisation, personnel, bâtiments, équipements ; (ii) caractérisation : test des objets et des systèmes ; (iii) règles : protocoles, procédures standard de fonctionnement ; (iv) résultats : données brutes, rapport final et archives ; (V) assurance qualité : surveillance extérieure du processus de recherche (WHO 2009, p. 10).

Ces normes GLP sont reprises dans deux directives européennes datant de 2004 (Directive 2004/9/CE et Directive 2004/10/CE), qui précisent que les laboratoires doivent répondre aux prescriptions établies par l'OCDE à travers les normes GLP. Elles ajoutent certaines précisions quant à la vérification du respect de ces normes dans les états membres (art. 1 et 2, Directive 2004/9/CE ; art. 1, Directive 2004/10/CE).

Ces normes GLP et les directives européennes seront obligatoirement respectées dans notre laboratoire de recherche.

Notons qu'en Belgique, c'est le Bureau Assurance Qualité (BAQ), faisant partie de l'Institut scientifique de santé publique (WIV-ISP) qui est considéré comme l'autorité compétente pour la surveillance GLP. L'autorité du BAQ découle de l'AR du 6 mars 2002.

De manière générale, l'adoption des mesures GLP, GQCP, ISO 15189 et ISO 17025 requièrent l'application de procédures écrites et la mise en place d'une structure organisationnelle particulière ayant cinq objectifs principaux (Huber n.d.) :

- Assurer la formation du personnel ;
- Organiser des audits internes et externes ;
- Valider les méthodes utilisées en laboratoire ;

- Qualifier et calibrer les équipements utilisés en laboratoire ;
- Fournir la preuve documentée que les procédures écrites ont été respectées à chaque étape de la production/recherche et assurer la traçabilité des déviations quand ce n'est pas le cas.

En choisissant un laboratoire possédant déjà l'ensemble de ces systèmes qualité, nous limitons les coûts liés à l'établissement de ce système au sein de nouveaux laboratoires. En effet, l'établissement de ces référentiels au sein d'un laboratoire a un coût d'environ 20 000 €, et son maintien annuel coûte aux alentours de 40 000 € pour les entreprises de moins de 20 employés (Myers 2012 ; InstantGMP n.d.).

4.2.1.3 Équipements de laboratoire

Dans ces laboratoires, nous aurions besoin de plusieurs installations indispensables, tels que qu'une machine de qPCR, des frigos (à +4°C) et congélateurs (-20°C et -80°C, pour la conservation des échantillons de nos clients et des consommables), une plaque chauffante, un vortex, une centrifugeuse, un flux laminaire, et un tank azote, en fonction de la pièce dans laquelle ils se trouvent. Les détails de prix de ces éléments se trouvent en annexe [> Annexes financières], selon les devis reçus.

4.2.2 Entrepôt

En phase 1, la valeur de notre stock sera quasi nulle. Quelques consommables en volume limité, seront utilisés pour la réalisation de nos tests, tandis que notre produit final n'apparaîtra que dans la phase 2.

La gestion des échantillons de nos clients sera donc assez simple. Ces échantillons, conservés dans nos installations à environ -80°C, peuvent comme nous l'avons mentionné plus haut, se garder cinq jours, en dessous du seuil de -70°C préconisé par la Haute Autorité de Santé (2009) sans subir de dommages majeurs. Un technicien pouvant, en une journée réaliser l'analyse d'un à vingt-cinq lots de cellules, ces échantillons pourront être analysés rapidement sans que leur qualité ne soit discutable, à condition évidemment de respecter le principe du *First In First Out* (FIFO), qui consiste à analyser en priorité les échantillons qui sont présents dans nos laboratoires depuis le plus long temps (Melyon 2004). Cette méthode sera facilement mise en place physiquement via quelques arrangements de catégorisation dans nos frigos par exemple.

En phase 2, la gestion des stocks sera plus délicate, non pas par leur date de péremption, assez longue (de l'ordre d'une année), mais principalement par leur valeur marchande assez élevée. Les matières premières nécessaires à la réalisation d'un package Telocell coûtent en effet 223,47 € par pièce, ce qui signifie que nous aurons

intérêt à limiter la taille de notre stock, privilégiant tant que faire se peut, un système de production à flux tendus (Ritzman & Krajewski 2010), afin d'éliminer le gaspillage en supprimant les stocks inutiles. Cela est cependant délicat à mettre complètement en place sans détériorer la flexibilité de notre solution qui doit pouvoir être utilisée dans des cas urgents. A noter que nos kits doivent être conservés dans des congélateurs à -20°C. Cet entreposage dans nos installations est cependant indispensable, car nous devons incorporer dans nos kits le contrôle tumoral pour la personnalisation des kits.

Concrètement, nous nous baserons sur nos prévisions pour commander la production de nos kits auprès de notre fournisseur, afin d'avoir en stock, en début de mois, ce que nous comptons vendre. Nous nous baserons pour cela sur nos contacts avec nos clients, qui planifient à l'avance leurs différents cycles de production.

Nos interviews nous ont en effet appris que peu d'entreprises de thérapie cellulaire pouvaient conserver longtemps les fameuses « cellules-médicaments » après les avoir prélevées chez le patient. En effet, la cryopréservation est un procédé spécifique dont ne bénéficient pas tous les futurs produits de thérapie cellulaire (maîtrisé selon nos interviews seulement par *Celyad*). Pour ces entreprises, il est donc indispensable de planifier relativement en avance le calendrier de production de leurs produits, calendrier que nous utiliserons nous-même pour évaluer la gestion de nos stocks.

4.2.3 Bureaux

En plus de ce laboratoire, nous avons prévu pour la gestion administrative, d'occuper des bureaux proches de notre laboratoire de recherche, nous permettant de travailler à trois et de nous concerter facilement sur une surface limitée.

En plus de cela, nous serons certainement amenés à réaliser d'éventuelles réunions externes, avec des clients, fournisseurs, investisseurs. Nous avons donc opté pour la location de salles de réunions d'incubateurs mises à disposition à un prix démocratique. C'est le cas du CEI à Louvain-la-Neuve dont nous utiliserons les tarifs pour notre plan financier. Cette formule nous donnera également l'opportunité de pouvoir échanger nos potentiels problèmes avec d'autres jeunes entrepreneurs, en bénéficiant de l'émulation des espaces de *coworking*, promesse d'innovation et de communauté (DeGuzman & Tang 2011).

4.3 Recherche et développement

La R&D est un pôle très important au sein de la future entreprise *Scancell*, puisqu'il nous permettra de rester concurrentiels sur le marché des biotechnologies où certains acteurs possèdent beaucoup de moyens et d'influence. En effet, dans le secteur pharmaceutique et plus généralement dans l'industrie des sciences de la vie, des recherches de qualité sont cruciales pour le succès de l'entreprise à long terme. Cependant, obtenir des fonds financiers adéquats pour mener ces recherches à bien représente un défi pour ce secteur, surtout lorsqu'un projet R&D est peu avancé (Mehta 2016 ; Howard 2013). Face à cette évidence, nous avons opté une stratégie de R&D réaliste. En effet, les recherches qui seront menées au sein de nos laboratoires durant les trois premières années d'existence de *Scancell* seront basées sur des expériences conduites dans le cadre de la collaboration entre Charlotte Bertrand et *Celyad*. Ainsi, nous pouvons plus aisément évaluer la faisabilité de nos projets R&D, ce qui devrait convaincre les investisseurs de croire en notre évolution scientifique. Les financements auxquels nous aurons recours pour garantir notre activité centrale de recherche et développement seront détaillés dans le plan financier. En tant que CTOO de l'entreprise, Charlotte Bertrand sera en charge de coordonner les activités de recherche et développement. Notre approche de la R&D au sein de l'entreprise *Scancell* sera intimement liée à la phase stratégique dans laquelle nous nous trouverons.

4.3.1 Phase 0

Durant les six premiers mois suivant la constitution de l'entreprise, l'unique objectif du département R&D sera de finaliser le développement des tests limites de Telocell, mais également de les valider selon les lignes conductrices de l'ICH. Pour rappel, notre package comprend trois tests, dont un a été validé en laboratoire au cours du stage de Charlotte Bertrand chez *Celyad* (« Mesure de l'expression du gène *hTERT* »). Les deux autres tests, qui consistent à identifier les cellules tumorales utilisant le mécanisme ALT d'allongement des télomères feront l'objet de développements supplémentaires qui nous permettront de résoudre les problèmes rencontrés durant les premières étapes de développement, comme expliqué en annexe [> Annexes scientifiques]. Ces tests sont présentés au Tableau 4.2.

Chaque manipulation nécessaire au reste du développement sera réalisée en laboratoire par Charlotte Bertrand, seul équivalent temps plein (ETP) de l'entreprise à ce moment de l'existence de *Scancell*. Nous avons ainsi prévu que la finalisation du développement des tests durerait trois mois. Un mois supplémentaire sera attribué à mettre en place la banque de lignées tumorales et à évaluer la pertinence des lignées tumorales sélectionnées précédemment dans ce chapitre [> 4.1 Logistique].

Tableau 4.2 – Développements à réaliser pendant les six premiers mois d'exercice en phase 0.

TEST	OBJECTIF	DURÉE
Détection des mutations ALT	Développer la qPCR <i>multiplex</i>	1 semaine 1 ETP
	Développer une méthode de qPCR pour la détection des mutations du gène <i>ATRX</i>	3 semaines 1 ETP
	Déterminer la spécificité pour toutes les mutations liées à ALT	2 semaines 1 ETP
	Déterminer la sensibilité pour toutes les mutations liées à ALT	2 semaines 1 ETP
Mesure de la longueur des télomères	Améliorer la spécificité de l'amplification télomérique	2 semaines 1 ETP
	Améliorer la qPCR <i>multiplex</i>	
	Déterminer la spécificité de l'identification des cellules ALT+	1 semaine 1 ETP
	Déterminer la sensibilité de l'identification des cellules ALT+	1 semaine 1 ETP

Afin de tenir compte d'éventuels imprévus, nous nous laissons une période « tampon » d'un mois au terme desquels les tests d'identification des cellules tumorales ALT-positives devront être développés et la personnalisation du contrôle mise au point. Pour valider ces deux tests, nous estimons que nous aurons besoin d'environ un mois.

4.3.2 Phase 1

Une fois nos tests de détection *in vitro* des cellules tumorales validés, notre offre à la thérapie cellulaire sera complète, et les tests pourront être commercialisés. A ce moment, la R&D agira alors simultanément sur deux fronts :

- le perfectionnement de Telocell ;
- l'élargissement de notre offre.

Par ailleurs, l'élargissement de l'offre de *Scancell* nous permettra de rester compétitifs sur le marché de la thérapie cellulaire, et plus généralement sur celui des biotechnologies. Deux options avaient été envisagées par les porteurs de projet pour le développement scientifique à moyen terme. Initialement, nous avions pensé nous spécialiser dans le contrôle qualité en thérapie cellulaire. Cela signifie qu'en plus des tests de sécurité, nous proposerions des tests d'identité, de potentialité, de stérilité, de pureté et de viabilité, qui représentent les cinq autres paramètres analysés pour permettre l'injection de produits de thérapie cellulaire. Nous aurions alors adopté pour une approche spécialiste, qui consiste à offrir une certaine profondeur de gamme pour un marché très ciblé. Cependant, cette idée a rapidement été abandonnée au profit d'une volonté de diversification de notre clientèle. Comme nous l'avons expliqué dans le troisième chapitre [*> 3.6 Evolution commerciale*], la thérapie cellulaire représente un marché de niche, dont les perspectives de croissance et d'évolution sont limitées et sur lequel l'implantation définitive représente un danger pour le futur de notre entreprise (Dauzat 2013). Face à cette problématique, nous avons déjà opté pour une exportation géographique à l'horizon 2020, qui devrait augmenter le nombre d'acteurs de la thérapie cellulaire que nous pourrions cibler et donc le volume des tests Telocell. Pour assurer la prospérité et éviter de rendre notre entreprise « statique », nous avons donc pris la décision de nous tourner vers d'autres catégories de clients, comme les entreprises développant des médicaments anti-cancéreux. Afin de garantir la faisabilité des études R&D, nous avons cependant décidé de conserver notre expertise initiale : la détection *in vitro* des cellules tumorales. Dans ce cadre, notre approche R&D sera plus généraliste, et consistera à développer/valider un panel de tests d'évaluation *in vitro* de la tumorigénicité.

Durant la première phase stratégique, nous nous attèlerons à développer le package Telocell en package quantitatif, c'est-à-dire qui permettra de déterminer le nombre de cellules tumorales qu'un échantillon contient. Ceci implique le développement et la validation de paramètres supplémentaires, comme nous l'avons évoqué dans

le deuxième chapitre [> 2.3 Offre]. Ainsi, d'autres catégories de clients – comme les entreprises développant des médicaments anti-cancéreux, qui l'utiliseront pour évaluer l'efficacité de leur thérapie – pourront bénéficier de notre expertise.

Mentionnons également que durant cette phase, prendra place la recherche et développement liée à la confection de nos kits de diagnostic pour Telocell (commercialisés à partir de la phase 2). Cependant, comme nous l'avons annoncé précédemment, la fabrication des kits ne relève pas de notre expertise et sera donc sous-traitée. Logiquement, la R&D qui y est liée sera prise en charge par notre sous-traitant spécialisé.

4.3.3 Phase 2

Comme nous l'avons expliqué dans le troisième chapitre [> 3.2 Déploiement stratégique en trois phases], l'entrée en phase 2 marque la commercialisation exclusive de Telocell sous la forme d'un kit. A ce moment, la production des tests Telocell ne prendra plus place au sein de nos laboratoires, étant donné que la phase de service sera achevée et que nous sous-traitons la production des kits. La R&D deviendra donc notre activité principale.

A ce moment, nous serons pleinement focalisés sur le développement de méthodes alternatives pour la détection des cellules tumorales *in vitro*.

4.4 Protection de l'innovation

Cette section a pour but d'expliquer les moyens par lesquels nous protégerons *Scancell* et son produit actuel, Telocell.

Dans un premier temps, nous allons appréhender l'innovation au sein d'une entreprise et donc plus précisément la notion de savoir-faire ainsi que les différents moyens de protection, qui sont principalement le brevet et le secret. Dans le cadre du projet *Scancell*, il semble que ces notions doivent être approfondies avant de poser notre choix final. Au sein du deuxième point, nous allons analyser ce qu'est un brevet et quelles en sont les conditions. En effet, il est nécessaire de vérifier si le produit développé par *Scancell* est brevetable ou non-brevetable. Troisièmement, il semble opportun de présenter la protection par secret. Enfin, après les présentations théoriques de chaque système de protection, nous analyserons la solution la plus adéquate dans le cas d'espèce.

4.4.1 Innovation en entreprise

Toute entreprise se doit de savoir ce qui peut être considéré comme du savoir-faire et comment le protéger lorsque cela consiste en une réelle innovation et que ce savoir-faire procure un avantage sur le marché. Le savoir-faire fait partie intégrante de la vie d'une entreprise. Dans le cadre du projet *Scancell*, un savoir-faire particulier a été développé autour du produit Telocell. Il a en effet été développé suite à des manipulations spécifiques au sein de laboratoires. Comme déjà expliqué précédemment, notre offre est une réelle innovation et une alternative possédant une base scientifique solide.

Depuis la révolution industrielle et l'émergence de la libre concurrence, l'avantage de posséder un savoir-faire a pris de plus en plus d'ampleur (Neven et al 2010, p. 54). Cet avantage peut jouer un rôle crucial dans le développement du projet *Scancell*. La notion de savoir-faire est relativement large et ne peut être que difficilement arrêtée car elle évolue au gré des innovations (Neven et al 2010, p. 60). Néanmoins, il est possible de différencier plusieurs types de savoir-faire qui pourront eux-mêmes bénéficier de différents types de protections (Neven et al 2010, p. 61).

- *Notion de savoir-faire*

A l'heure actuelle, il n'existe pas de définition du savoir-faire ayant une portée générale (Neven et al 2010, p. 56). La définition la plus générale est celle proposée par l'AIPPI (Association Internationale pour la Protection de la Propriété Intellectuelle), qui dit ceci : « *on appelle savoir-faire des connaissances et expériences de nature technique, commerciale, administrative, financière ou autre, qui sont applicables dans la pratique pour l'exploitation d'une entreprise ou l'exercice d'une profession* » (AIPPI 1974, pp. 47-48).

D'autres régimes juridiques traitent également la notion de savoir-faire, ainsi, en droit communautaire, il est possible de retrouver certaines définitions du savoir-faire dans des règlements, définitions valables dans les limites du domaine du règlement en question (Neven et al 2010, p. 56). En rassemblant les similitudes des différentes définitions, il est possible de proposer une définition générale propre au contexte communautaire précis qu'est le droit de la concurrence (Neven et al 2010 pp. 56-57). Notons également que la directive sur le savoir-faire de la Commission adopte une définition identique aux Accords Internationaux sur la Protection des Droits Intellectuels (ADPIC) (Strowel 2014, p. 17).

En droit international, les ADPIC envisagent les conditions de protection des « renseignements non divulgués » (Neven et al 2010, p. 58), ainsi, dans l'article 39, les ADPIC se concentrent uniquement sur la protection de certains renseignements, dans le but de les protéger de la concurrence lorsque l'entreprise garde ces informations secrètes (Neven et al 2010, pp. 58-59).

En doctrine coexistent plusieurs définitions du savoir-faire, chacune d'elle présentant une ou plusieurs particularités. M. Buydens (Buydens 1999, pp. 291-292) en a rassemblé les caractéristiques principales (Neven et al 2010, p. 59).

- *Protection du savoir-faire*

Ni le droit belge, ni le droit européen ou international ne prévoit de régime spécifique de protection du savoir-faire ; plusieurs normes issues de différentes branches du droit abordent la protection du savoir-faire, mais elles ne s'appliquent que dans certaines situations concrètes et n'ont pas une valeur générale et abstraite (Neven et al 2010, p. 62 ; De Gryse 2003, pp. 36-37).

Dans le but de faciliter l'analyse de la protection du savoir-faire, la doctrine a divisé le savoir-faire en trois types différents (Neven et al 2010, p. 61).

Premièrement, nous avons le « tour de main », ce qui correspond à l'habileté personnelle et ne peut donc être dissocié de la personne. Ce premier type de savoir-faire ne peut donc être transmis et ne nécessite donc pas de protection particulière. Deuxièmement, nous avons le « savoir-faire brevetable ». C'est un savoir-faire qui répond à toutes les conditions de brevetabilité d'un produit ou d'un procédé. Néanmoins un tel savoir-faire ne doit pas être protégé spécialement par un brevet mais le secret lui est également ouvert. Enfin, le savoir-faire non brevetable est une catégorie résiduaire qui comprend essentiellement « *des méthodes administratives, commerciales, [...] exclues du champ de la*

brevetabilité » (Neven et al 2010, pp. 61-62).

Il n'existe pas de monopole légal protégeant le savoir-faire, sauf le savoir-faire brevetable et breveté. En effet, comme le souligne Fernand De Visscher « *au cas où un tiers reproduit ou utilise des informations qu'une entreprise juge lui appartenir à titre d'informations confidentielles, il ne suffira pas à celle-ci de s'en prévaloir pour arrêter cette activité du tiers. L'entreprise devra dans tous les cas démontrer le manquement de la partie qu'elle attaque à une règle contractuelle ou extracontractuelle* » (De Visscher 2007, p. 283).

Etant donné que le droit ne prévoit pas de monopole légal, le seul moyen d'obtenir un monopole est en gardant le savoir-faire secret (« secret d'affaires ») (De Gryse 2003, pp. 12 et 37). La notion de secret d'affaires est plus large que le savoir-faire mais l'inclut malgré tout. La protection par secret est relativement précaire mais possède certains avantages par rapport à la protection par brevet : il n'est pas limité dans le temps, est peu coûteux, et donne un monopole de fait comparable sans obligation de divulgation (Neven et al 2010, p. 67).

4.4.2 Brevet

Le brevet a depuis toujours été un droit à caractère international. Dès la fin du 19^e siècle, on voit apparaître la première convention internationale : la Convention générale d'Union de Paris du 20 mars 1883, cette convention est la base de l'internationalisation du droit de la propriété intellectuelle et s'apparente presque à une loi (Remiche & Cassiers 2010, p. 44). L'internationalisation de ce droit et l'uniformisation des conditions d'octroi du brevet permettent à des sociétés telles que *Scancell* de protéger son savoir-faire et de déposer ainsi plusieurs brevets.

4.4.2.1 Notion de brevet

Le droit des brevets d'invention est réglementé à plusieurs niveaux et plusieurs normes se superposent et se complètent pour interpréter l'ensemble des droits et obligations liés à l'obtention d'un brevet. La notion de brevet et ses caractéristiques sont, depuis les ADPIC, définies de manière relativement homogène dans le monde.

En Belgique, c'était la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention (LBI) qui précisait le régime des brevets, mais cette loi a été remplacée par les articles XI.1 et suivants du Code de droit économique (CDE) aux articles XI.1 et suivants. En son article XI.3, le CDE nous dit qu'un brevet d'invention est un « *un droit exclusif et temporaire d'interdire aux tiers l'exploitation de toute invention, dans tous les domaines technologiques,*

qui est nouvelle, implique une activité inventive et est susceptible d'application industrielle ».

4.4.2.2 Conditions classiques de brevetabilité

Les conditions classiques de la brevetabilité, au nombre de quatre, se trouvent dans la majorité des régimes de brevets grâce à l'harmonisation mondiale du droit des brevets.

L'instrument international le plus important et le plus récent à cet égard sont les ADPIC, signée dans le cadre de la création de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC). L'Union européenne et la Belgique sont membres de l'Organisation mondiale du commerce et sont donc soumis aux ADPIC. Ces accords prévoient, à l'article 27, paragraphe 1, les conditions cumulatives de brevetabilité d'un brevet : l'invention, la nouveauté, l'activité inventive ou la non évidence et la susceptibilité d'application industrielle ou l'utilité. Il semble donc opportun à ce stade de préciser ces caractéristiques pour ensuite les confronter aux tests développés par *Scancell*. De plus, nous analyserons la condition d'ordre public et de bonnes mœurs ainsi que sa pertinence dans le choix d'octroi du brevet par les bureaux de brevet.

Avant de rentrer dans le détail de ces conditions, rappelons que *Scancell* propose trois tests de détection *in vitro* des cellules tumorales, basés sur la théorie des télomères. Plus précisément, nous nous intéressons aux deux mécanismes d'allongement des télomères – la télomérase hTERT et le mécanisme ALT -, qui permettent aux cellules tumorales de se diviser de manière indéfinie et, par là même, d'être immortelles.

Notre package contient donc :

- un test d'identification des cellules télomérase-positives (c'est-à-dire qui utilisent le mécanisme de la télomérase pour allonger leurs télomères), qui consiste à mesurer l'expression du gène *hTERT* ;
- deux tests d'identification des cellules ALT-positives (c'est-à-dire qui utilisent le mécanisme ALT pour allonger leur télomères), via une détection de mutations spécifiques à celles-ci et une mesure de la longueur moyenne de leurs télomères. Les détails techniques de nos tests sont présentés dans le deuxième chapitre [> 2.3 Offre], ainsi qu'en annexe [> Annexes scientifiques].

De plus, nous confronterons également les conditions de brevetabilité aux recherches menées pour la personnalisation du contrôle tumoral.

- *Invention*

Pour qu'il y ait invention il faut une création technique qui soit le fruit d'un travail intellectuel et que cette création soit nouvelle et non évidente (Remiche & Cassiers

2010, pp. 82-83). Dans ce cadre, nous pouvons affirmer que le produit développé par *Scancell* correspond à une invention étant donné que les tests ainsi que la combinaison des tests est une solution technique qui vise à pallier l'absence de méthodes fiables pour la détection *in vitro* de cellules tumorales.

- *Nouveauté*

En Europe, la condition de nouveauté est précisée au sein de la convention de Munich (CBE) (art. 54, Convention du 5 octobre 1973). La Convention précise que la nouveauté est appréciée au regard de l'état de la technique, c'est-à-dire tout ce qui est ou a été accessible au public de manière orale ou écrite ou tout autre moyen (art. 54, Convention du 5 octobre 1973). C'est donc une compréhension très large de la notion de nouveauté qui prime (Bruxelles, 16 juin 2006, *Ing.-Cons.*, 2006, p. 503 ; Civ. Anvers, 28 mai 1993, *Ing.-Cons.*, 1995, p. 34 ; CRT, 31 octobre 2001, T-1080/99 ; *JOOEB* 2002, p. 568 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 93). Le critère de nouveauté est apprécié à la date de dépôt de la demande ou à sa date de priorité (art. 54, CBE et art. XI.6, CDE). En Belgique, le critère de nouveauté « absolue » est également appliqué (art. XI.6, CDE).

Afin de vérifier la nouveauté de l'invention de *Scancell* nous avons réalisé une étude d'antériorité. L'analyse de l'art antérieur a permis de déterminer que les trois méthodes contenues dans notre package se basent sur des principes qui sont connus de l'état de la technique. La nouveauté de cette invention réside en deux points. Premièrement, l'application de certaines de ces techniques est conforme au critère de nouveauté de par le fait que cela n'a jamais été mentionné. Ceci est valable pour les tests « Détection des mutations ALT » et « Mesure de la longueur des télomères », car ils sont utilisés comme tests d'identification des cellules tumorales ALT-positives. Ensuite, c'est la combinaison des trois tests dans notre procédure qui constitue une innovation et n'est décrite à aucun moment dans l'état de la technique. Nous considérons le résultat de la combinaison des tests dépasse l'addition des résultats de chacun de ceux-ci et ajoute donc clairement une plus-value.

C'est en effet la combinaison originale des ces trois tests qui permet de couvrir l'ensemble des mécanismes et donc d'assurer la fiabilité de détection *in vitro* des cellules tumorales. Cependant, le critère de synergie de cette combinaison pourrait être remis en cause. De fait, les cellules tumorales sont soit hTERT-positives, soit ALT-positives. Si même un des tests donne un résultat positif, on considérera que l'échantillon est tumoral. Certains examinateurs pourraient donc les considérer comme indépendants.

Du côté des développements prévus pour les premiers mois de la société, nous allons nous baser sur l'utilisation de différentes lignées tumorales pour personnaliser les tests. Le lien entre des lignées tumorales données et certains cancers a déjà été établi par d'autres scientifiques. Néanmoins, personne n'a encore évoqué la possibilité d'utiliser

cela pour l'appliquer dans la détection personnalisée de cellules tumorales.

- *Activité inventive/non évidence*

Les législations européenne et belge (art. 56, CBE ; art. XI.7, CDE) prévoient une condition d'activité inventive, les termes utilisés par les deux régimes étant relativement similaires. La Convention sur le brevet européen (CBE) nous dit qu'il y a activité inventive si « *pour un homme de métier, elle [l'invention] ne découle pas d'une manière évidente de l'état de la technique* » (art.56, CBE).

Les notions d'activité inventive ou de non évidence peuvent être considérées comme des synonymes ; la jurisprudence belge utilise d'ailleurs les deux (Bruxelles, 17 septembre 2004, *Ing.- Cons.*, 2004, p. 367). Il semble important d'analyser les critères d'appréciation de l'activité inventive.

En Europe et en Belgique, il faut que les revendications ne découlent pas de « *manière évidente* » de « *l'état de la technique* ». Au niveau européen, l'état de la technique est défini à l'article 54 (2) de la CBE alors qu'en droit belge, on retrouve la définition à l'article XI.6, paragraphe 2 du CDE. L'Office Européen des Brevets (OEB) utilise souvent l'approche problème-solution qui est composé de trois étapes : « *(i) déterminer l'état de la technique le plus proche, (ii) établir le problème technique objectif à résoudre, et (iii) examiner si l'invention revendiquée [...] aurait été évidente pour l'homme de métier* » (Ballester Rodés et al 2013, pp. 187-188 ; Remiche & Cassiers 2010, pp. 116-119). L'OEB a établi le critère d'espérance raisonnable de réussite, applicable notamment dans le domaine des biotechnologies (CRT, 31 août 1990, T-60/89 ; JOOEB 1992, p. 268).

Au niveau du droit belge, la jurisprudence précise qu'il faut considérer l'état de la technique dans son ensemble, et que les revendications vont au delà du développement logique et continu de l'état de la technique (Civ. Liège, 7 janvier 2005 ; IRDI 2005, p. 157 ; Bruxelles, 17 septembre 2004, *Ing.- Cons.*, 2004, p. 367 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 110).

Ensuite, il semble opportun d'approfondir la signification du terme homme de métier. Selon la jurisprudence belge et celle de l'office européen des brevets, c'est un personnage possédant une bonne connaissance de la technique, ayant accès à l'état de la technique et faisant preuve d'une certaine intelligence pour apporter des solutions à des problèmes courants dans son secteur. Autrement dit, il applique ses connaissances pour résoudre les problèmes et ne dispose pas d'un esprit inventif (Civ. Liège, 10 février 1999, *Ing.-Cons.*, 1999, p. 434 ; Civ. Liège, 7 janvier 2005 ; IRDI 2005, p. 157 ; Civ. Bruxelles, 28 novembre 2008 ; IRDI 2009, p. 147 ; CRT, 14 février 1996, T-39/93 ; JOOEB 1997, p. 134 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 93).

Enfin, quant au côté pratique de l'analyse, il est possible de dire que le travail réalisé pour Telocell reflète un travail d'inventivité mitigé. En effet, certains tests ont requis une activité inventive vraiment minime voire nulle, comme c'est par exemple le cas pour le test « Détection des mutations ALT » du package. En effet, pour ce test, nous nous contentons d'appliquer une méthode précédemment décrite de criblage des mutations par qPCR aux gènes spécifiquement mutés dans les cellules ALT-positives. Par contre, le test de « Mesure de la longueur des télomères » respecte le critère d'activité inventive car il n'est pas évident à l'heure actuelle d'utiliser ce test comme test d'identification des cellules ALT-positives. Le fait que les cellules ALT-positives possèdent une longueur moyenne des télomères plus élevée que la normale est un principe qui n'est pas encore détaillé et évident pour l'homme de métier ; il est le fruit d'études menées au cours de ce mémoire. De plus, le choix des trois tests finaux peut être considéré comme de l'activité inventive de la part de Charlotte Bertrand et des équipes scientifiques de *Celyad*, et tout homme de métier, au vu de l'état de la technique, n'y aurait pas pensé automatiquement. En effet, il existe une multitude de tests différents pour analyser les mécanismes d'allongement des télomères (télomérase et ALT) et il aurait été possible d'en choisir d'autres. La combinaison spécifique de ces méthodes permet de fournir une détection fiable des cellules tumorales.

En ce qui concerne le concept même de personnalisation du contrôle, il ne fait pas preuve d'activité inventive en tant que tel car tout homme de métier aurait pu y penser ; changer le contrôle positif d'un test n'est pas révolutionnaire. Par contre, le choix des lignées tumorales que *Scancell* proposera pour la personnalisation du contrôle est issu d'une réelle activité inventive. Il est en effet le fruit de recherches théoriques et pratiques (menées en laboratoire), ayant pour but d'identifier le matériel cellulaire initial des thérapies cellulaires belges, d'y faire correspondre la forme la plus prévalente de cancer, et d'en sélectionner une lignée tumorale pertinente. Cette démarche et cette réflexion dépasse la logique de base du développement technique dont ferait preuve un homme de métier dans notre secteur. Pour plus d'information sur cette démarche et les lignées sélectionnées, voir le début de ce chapitre [> 4.1 Logistique].

- *Application industrielle*

Tant la Convention de Munich que le CDE prévoient que l'invention revendiquée dans le brevet doit être susceptible d'application industrielle (art. 52, CBE ; art. XI.3, CDE).

Le code belge reprend l'article 57 de la CBE en précisant qu'une « *invention est considérée comme susceptible d'application industrielle si son objet peut être fabriqué ou utilisé dans tout genre d'industrie* » (art. XI.8, CDE). Il est nécessaire de préciser la notion d'industrie. Plusieurs définitions sont possibles, notamment celle donnée par l'OEB qui a choisi une interprétation relativement large : « *toute activité physique de caractère*

technique » (directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB (avril 2009), C-IV-14 et 15 ; CRT, 27 mars 1986, T-144/83 ; JOOEB 1986, p. 301 ; CRT, 14 octobre 1987, T-116/85 ; JOOEB 1989, p. 13 ; CRT, 14 mai 1985, T-36/83 ; JOOEB 1986, p. 295 ; CRT, 9 novembre 1994, T-74/93 ; JOOEB 1995, p. 712 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 120). Certains auteurs se sont attelés à une interprétation de la notion, ainsi, la définition de Mathély semble pour de nombreux spécialistes pertinente : « *l'industrie est toute action de l'homme pour façonner et utiliser la nature et la matière* » (Mathély 1978, p. 134 ; Mousseron 1984, pp. 234-246 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 120). Le lien entre l'invention et l'application industrielle peut être faible (Mousseron 1984, p. 235 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 121).

Dans le cadre du projet *Scancell*, il est clair que l'invention remplit toutes les conditions pour être considérée comme étant susceptible d'application industrielle. En effet, les tests ainsi que les lignées tumorales destinées à la personnalisation peuvent être produits de manière répétitive pour ensuite être vendu à nos futurs clients, sous la forme d'un service (phase 1) ou d'un kit (phase 2).

- *Licéité*

La condition de licéité découle de l'exclusion de la brevetabilité d'une invention qui serait contraire à l'ordre public ou aux bonnes mœurs. Les ADPIC prévoient que, sous certaines conditions, il est possible pour les Etats d'exclure de la brevetabilité des inventions, dans le but de protéger l'ordre public ou les bonnes mœurs (art. 27, §2, ADPIC).

La CBE au niveau européen et le CDE en Belgique ont appliqué cette condition, tout en précisant que les inventions ne sont pas considérées comme contraires à l'ordre public ou aux bonnes mœurs simplement parce qu'une disposition légale ou réglementaire interdit une telle invention (art. 53, (a), CBE ; art. 6, 1, Directive 98/44/CE ; art. XI.5, §4, CDE).

La jurisprudence de l'OEB et la doctrine ont pris soin d'éclaircir la notion d'ordre public et de bonnes mœurs (CRT, 21 février 1995, T-356/93 ; JOOEB 1995, p. 545 ; Ballester Rodés et al 2013, pp. 50-51). Certains auteurs définissent la notion de bonnes mœurs comme étant « *l'habit juridique de l'éthique* » (Chemtob & Gallochat 2006, p. 84 ; Bergmans 1991, p. 198).

L'invention de *Scancell* intervient dans le milieu des biotechnologies et permet d'analyser le potentiel tumoral de lots de cellules *in vitro*. Notre invention, venant uniquement analyser des lots de cellules déjà développées, ne contrevient manifestement pas à l'ordre public et aux bonnes mœurs selon les critères actuels. De plus, précisons également que nous n'entrons pas dans les catégories d'exclusion de brevetabilité prévues au niveau international européen et national (art. 27, §3, ADPIC ; art. 53, (c), CBE et art. XI.5, CDE).

Les différentes législations précisent que les méthodes de diagnostic sont exclues lorsqu'elles sont appliquées à l'homme (Remiche & Cassiers 2010, p. 126), ce qui n'est pas le cas de *Scancell*. L'exclusion de la brevetabilité est une exception et doit donc être interprétée de manière stricte. Pour qu'une méthode de diagnostic puisse être exclue il faut que la méthode comprenne l'entièreté du processus de diagnostic permettant d'établir le traitement médical à suivre (Remiche & Cassiers 2010, p. 127). Cette exclusion est la seule se rapprochant du projet *Scancell* et comme nous venons de le démontrer ne s'applique pas à notre situation et aux produits que nous proposons.

4.4.3 Secret d'affaires

Le secret semble le moyen le plus pertinent pour protéger le savoir-faire qui sera en possession de *Scancell*. Nous allons voir les moyens légaux que peut utiliser *Scancell* pour protéger ce secret et s'assurer une protection effective.

En Belgique, il n'existe pas encore de régime, unique et cohérent pour la protection du savoir-faire, du secret d'affaires ou autre notion correspondante (Wyckaert et al 2001, p. 2). Les secrets d'affaires ne sont pas considérés comme octroyant un droit de propriété intellectuelle (Kaesmacher et al 2010, p. 374). Avant d'aborder les différents régimes et moyens permettant de protéger un secret d'affaires, nous commencerons par une brève analyse de la directive de la commission européenne datant du 14 avril 2016.

4.4.3.1 La directive du 14 avril 2016

Selon l'interprétation donnée par la Cour Européenne des Droits de l'Homme (CEDH), l'entreprise a droit au secret d'affaires conformément à l'article 8 de la Convention de sauvegarde des droits de l'homme et des libertés fondamentales (Buydens 2014, p. 33). A travers son arrêt *Amman* du 16 février 2000, la CEDH octroie un droit à la vie privée aux personnes morales sur la base de l'article précité ; ce principe a ensuite été confirmé à plusieurs reprises par la jurisprudence de la CEDH (CEDH, 16 février 2000, *Aman c. Suisse*, §65).

Pour le moment, une grande diversité des régimes de protection cohabitent en Europe (Buydens 2014, p. 33). Certains pays prévoient des législations spécifiques (Suède), d'autres laissent la jurisprudence se saisir de la question (Irlande et Royaume-Uni) mais la plupart des pays protègent le droit aux secrets d'affaires à travers une multitude de législations en différentes branches de leur droit national (Belgique, Pays-Bas, Allemagne) (Buydens 2014, p. 33). Nous analyserons les différents moyens mis en place par la Belgique dans les sections suivantes.

Les divergences quant à la notion de secret d'affaires et sa nature juridique ne facilitent

pas la vie des entreprises, car ces différences ont de réelles implications pratiques pour la vie économique (Buydens 2014, pp. 35-36). La directive a pour ambition de venir régler ces trois problématiques. Tout d'abord, la directive apportera une homogénéité plus grande au sein de l'Union. Ensuite, la directive propose une définition reprenant les critères proposés à l'article 39 ADPIC (Buydens 2014, p. 37). Enfin, elle rejette l'acceptation du secret d'affaire comme un nouveau droit de propriété intellectuelle (Buydens 2014, p. 38).

4.4.3.2 Protection par le droit pénal

Le droit pénal protège les secrets de fabrique. L'article 309 du code pénal prévoit que « *celui qui aura méchamment ou frauduleusement communiqué des secrets de la fabrique dans laquelle il a été ou est encore employé, sera puni [. . .]* ». La punition est soit une amende soit une peine de prison (art. 309, C. pén.). L'article n'a pas une large portée et pour pouvoir punir la personne responsable, il faut prouver que les quatre conditions prévues soient réunies.

Tout d'abord, nous devons analyser la notion de secret de fabrique. Sans définition légale, la Cour de cassation a pris le relais et défini le terme : « *fait technique qui, contribuant à la réalisation des opérations mises en œuvre dans une fabrique pour obtenir un produit déterminé, est de nature à procurer au fabricant des avantages techniques et à lui assurer sur ses concurrents une supériorité d'une nature telle qu'il y a pour lui un avantage économique à ce qu'il ne soit pas connu de ses concurrents* » (Cass., 27 septembre 1943, *Pas.*, I, p. 358). Autrement dit, c'est donc une connaissance secrète de la fabrique qui procure un avantage concurrentiel à son détenteur (Remiche & Cassiers 2010, pp. 650-654).

Ensuite, le Code pénal ne sanctionne qu'en cas de communication à un tiers. Un ancien employé peut donc, sans contrevenir à l'article 309 du Code pénal, utiliser les secrets pour lui-même. Néanmoins, nous verrons que d'autres régimes peuvent protéger l'employeur contre de tels agissements d'un de ses anciens employés, ouvriers ou cadres. Le champ d'application est donc fortement limité par cette condition de communication à un tiers (Remiche & Cassiers 2010, p. 654 ; De Visscher 2003, p. 66). Ajoutons que la tentative de communication n'est pas punissable. Par contre, toute communication, même partielle, du secret est punissable conformément à l'article 309 du Code pénal (Remiche & Cassiers 2010, p. 655). Sauf en cas de complicité, le tiers bénéficiant de la communication peut utiliser le secret et ne sera pas soumis à une punition sur base du code pénal, celui-ci ne sanctionnant que l'auteur de la communication (Remiche & Cassiers 2010, p. 655 ; De Visscher 2003, p. 67).

Enfin, il faut une intention qualifiée de méchante ou frauduleuse. Il faut donc que dans le chef de l'employé ou ancien employé existe une intention de nuire ou la volonté d'en tirer un avantage (Remiche & Cassiers 2010, p. 655 ; De Visscher 2003, p. 67). Il suffit

de prouver l'intention et non pas la réalisation de l'intention. Etant donné qu'on est face à un dol spécial, il est évident que la divulgation doit avoir été faite consciemment par l'auteur de la communication (Remiche & Cassiers 2010, p. 655). Cela implique notamment que l'employeur attire l'attention de ses employés sur le caractère secret de certaines informations (Remiche & Cassiers 2010, p. 655).

Nous voyons donc que les conditions imposées pour pouvoir poursuivre sur base de cet article du Code pénal sont précises et rarement remplies de manière cumulative dans la pratique. Malgré tout, il reste important de savoir qu'une telle possibilité existe et que le secret de fabrique peut être protégé de cette manière. Par ailleurs, cela ne s'applique qu'aux employés qui sont déjà soumis à un contrat de travail, qui comme nous le verrons inclut certaines conditions concernant la confidentialité.

4.4.3.3 Protection prévue par le droit du travail

La loi sur le contrat de travail (LCT) (Loi du 3 juillet 1978 relative aux contrats de travail) a mis en place un régime de protection du savoir-faire. Ce régime prévu par l'article 17 de la LCT est basé sur un enseignement jurisprudentiel de la Cour de cassation (Remiche & Cassiers 2010, p. 657). La Cour de cassation a affirmé que l'obligation de non divulgation des secrets d'affaires est une obligation implicite se retrouvant dans tous les contrats de travail ; cette obligation découle de l'obligation d'exécuter le contrat de travail de bonne foi (Remiche & Cassiers 2010, p. 657).

La LCT prévoit en son article 17, 3° l'interdiction de divulguer ou utiliser un secret de fabrication ou de poser des actes de concurrence déloyale.

Cette disposition offre une protection relativement large à l'employeur (Willems & Van Parys 2014, p. 304). Malgré tout, certaines limites sont prévues. Tout d'abord, la LCT ne protège que les informations qui sont secrètes. Ensuite, nous voyons que la loi prévoit que la protection est limitée aux informations dont l'employé aurait pris connaissance lors de l'exercice de son activité professionnelle ; cela ne concerne donc pas toutes les informations (Remiche & Cassiers 2010, p. 658). Néanmoins, contrairement à ce qui est prévu en matière pénale, ici la LCT n'exige pas un dol spécial lié à la communication de l'information (Neven et al 2010, p. 98). La simple divulgation suffit, peu importe le tiers à qui l'information est communiquée, même un collègue de travail (Remiche & Cassiers 2010, p. 658). Précisons également que, vu l'objet de la loi en présence, les seules personnes concernées par cette disposition sont les personnes liées à l'entreprise par un contrat de travail, à l'exclusion de tout autre contrat (Remiche & Cassiers 2010, p. 658). Pour venir renforcer le premier point, le législateur a ajouté au point b) de l'article 17, 3° de la LCT, l'interdiction de se livrer à tout acte de concurrence déloyale (Lebe-Dessard

2003, p. 255). Le législateur ne prévoit aucune limitation dans le temps, et donc tant l'obligation de non divulgation de secret que l'interdiction de concurrence déloyale reste d'application après la fin du contrat de travail (Remiche & Cassiers 2010, p. 659 ; Lebe-Dessard 2003, p. 255).

On peut voir ici que *Scancell*, ne doit pas s'inquiéter outre-mesure lors de la divulgation d'informations envers un employé. En effet, le régime légal limite déjà la possibilité pour les employés d'utiliser ces informations. Néanmoins, il reste important de ne dévoiler que ce qui est nécessaire à l'employé pour réaliser le travail demandé ; un partage trop important d'informations secrètes est donc à éviter.

Pour finir, notons que tout comme en droit pénal, la LCT se concentre uniquement sur la divulgation du secret et non pas sur la « *mise en œuvre du savoir-faire par l'employé lui-même en dehors de l'entreprise* » (Remiche & Cassiers 2010, p. 659). Il est possible d'ajouter dans les contrats de travail une clause de non-concurrence qui devra dès lors respecter certaines limites et conditions imposées par la LCT, notamment aux articles 65 et 86 de cette loi ; nous en parlerons dans la section suivante.

4.4.3.4 Protection par concurrence déloyale et article 1382 du Code civil

- *Principes de base*

Basée sur le principe de la liberté, il existe en droit économique une liberté de commerce et d'industrie (Gilson et al 2012, p. 165). Il découle de cette liberté plus générale, le droit à la concurrence, c'est-à-dire le droit de proposer des produits identiques à ceux qui existent déjà sur le marché (Remiche & Cassiers 2010, p. 669). Trois conséquences découlent de ce principe fondamental. Premièrement, cela exclut toute protection possible de ce qui n'existe qu'au stade d'idée ou de concept (Remiche & Cassiers 2010, p. 669). En effet, dans le cas contraire on s'éloignerait de l'objectif, qui est d'assurer le bien-être de la société par l'innovation (Remiche & Cassiers 2010, p. 669). Deuxièmement, toujours dans le respect du même objectif, chaque personne est libre de contracter, de créer des droits et obligations qui les lient (Remiche & Cassiers 2010, p. 669). Troisièmement, chaque personne a la liberté d'entreprendre ; cette liberté a été reconnue comme une liberté fondamentale mais pas absolue (Cass., 12 juillet 1917, *Pas.*, 1918, I, p. 65 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 669).

- *Liberté d'entreprendre*

Comme nous l'avons évoqué précédemment la liberté d'entreprendre, dorénavant consacrée à l'article II.3 du CDE, est une conséquence de la liberté de commerce et

d'industrie qui a été mise en place par l'article 7 du décret du 2-17 mars 1791, dit le décret d'Allarde (Remiche & Cassiers 2010, p. 670). Malgré son antériorité à la Constitution belge, ce décret n'a pas été jugé contraire aux dispositions constitutionnelles. Les différentes Cours suprêmes du Royaume « *ont également eu l'occasion de rappeler l'existence de cette liberté dans leurs décisions* » (CA, 11 février 1993 ; JT 1993, p. 359 ; CE, 13 juillet 1993 ; JLMB 1993, p. 1442 ; Neuray p. 1447-1452 ; Cass., 12 juillet 1917, *Pas.*, 1918, I, p. 65 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 670). Cette liberté implique qu'il est légal de copier le produit ou le service d'un concurrent, tant que l'objet de la copie ne viole pas une protection spécifique (Remiche & Cassiers 2010, p. 670). Il existe des actes qui sont par natures licites (« *le détournement de clientèle ; le débauchage de fournisseurs ; le débauchage de personnel ; l'imitation du concurrent et la copie de ses prestations ou de ses tarifs et l'utilisation du savoir-faire d'un autre vendeur* ») mais qui peuvent dans certains cas être considéré comme illicites lorsqu'ils violent une protection spécifique ou lorsqu'ils sont accompagnés d'un autre acte illicite (Remiche & Cassiers 2010, p. 670).

- *Concurrence loyale et déloyale*

Nous avons donc vu que la concurrence était autorisée mais pas de n'importe quelle manière. En effet, certaines limites sont à respecter pour rester dans une concurrence dite loyale. Si ces conditions ne sont pas remplies, on peut se trouver en situation de concurrence déloyale, qui elle est bien évidemment interdite (Remiche & Cassiers 2010, pp. 672 et 683). Plusieurs instruments juridiques internationaux et nationaux encadrent la concurrence (Remiche & Cassiers 2010, pp. 672-679).

Dans le cadre de cette protection générale prévue par les différents instruments, on observe que les moyens sont multiples et nombreux pour venir diminuer la précarité de la protection du savoir-faire par secret. Il est en effet possible d'interdire des tiers d'utiliser certaines informations qu'ils auraient obtenues de manière déloyale et qui ne seraient pas jugées honnêtes. Même si cette protection n'est pas des plus optimales, cela évite à une entreprise comme *Scancell*, possédant un savoir-faire, d'être démunie face aux autres entreprises en cas d'agissements déloyaux.

4.4.3.5 Protection grâce au droit des contrats

Nous avons vu que le régime légal prévoyait certaines protections. Ces protections ne suffisent pas toujours et il est judicieux d'utiliser les relations contractuelles avec des tiers pour augmenter sa protection en liant contractuellement ce tiers à des clauses limitant sa marge de manœuvre quant à l'utilisation ou la divulgation d'informations jugées secrètes. Le droit des contrats peut donc jouer un rôle important dans la protection du savoir-faire. Dans ce but, il propose différentes possibilités de limiter l'échange, la divulgation et l'utilisation d'information secrètes. Les principaux moyens mis en place seront les clauses de confidentialité, les clauses de non-concurrence et enfin, les

contrats relatifs à l'exploitation du savoir-faire. Nous reviendrons ultérieurement sur ces possibilités [> 4.6 Gestion des relations commerciales].

4.4.3.6 Mesures pratiques pour la protection du secret

Nous avons vu qu'il existait une multitude de possibilités légales et contractuelles pour limiter le risque de divulgation du secret (voir ci-dessus et plus loin [> 4.6 Gestion des relations commerciales]), mais il est nécessaire d'accompagner ces protections de certaines mesures plus pratico-pratiques mais néanmoins tout aussi importantes. Suite à certaines lectures (Strowel 2014, p. 18) mais aussi suite aux observations réalisées chez *Celyad* et les différentes entreprises que nous avons pu visiter lors de nos recherches, nous avons retenu certains comportements nécessaires à une bonne protection du secret.

Une des premières mesures est d'imposer à tous les membres du personnel la nécessité de scanner un badge et de taper un code pour entrer dans l'entreprise. Ensuite, à chaque entrée et sortie de laboratoire, il est nécessaire de scanner son badge personnel. En ce qui concerne le travail en laboratoire, nous adopterons des rapports de recherche sous format électronique, qui seront stockés sur un réseau informatique sécurisé. Afin d'éviter tout problème, tous ces documents informatiques doivent être imprimés et insérer dans des fardes que nous demanderons de ranger dans des armoires verrouillées. Enfin, au niveau informatique, les boîtes mails devront également être sécurisées afin d'éviter toute infiltration de pirates informatiques sur les boîtes mails des dirigeants ou employés de *Scancell*. Le réseau informatique sera sécurisé par une entreprise spécialisée (nous savons que *Celyad* travaille par exemple avec *BO Partner*).

Enfin, toute personne externe devra enregistrer son entrée et sa sortie de nos bâtiments et être munie d'un badge « visiteur ». De plus, aucune personne externe à l'entreprise (client, fournisseur, agent de maintenance, visiteur) ne peut être laissée seule au sein de l'entreprise ; elle devra donc être accompagnée pour toute la durée de sa visite.

4.4.4 Choix final : secret ou brevet ?

Ces développements juridiques sont essentiels à toute société en possession d'un produit ou procédé innovant et unique sur le marché à l'heure d'opérer un choix stratégique entre le brevet ou le secret. La particularité de notre projet et nos analyses nous permettent de penser que le kit mis au point par *Scancell* peut être considéré comme brevetable. Cependant, certains critères de brevetabilité, tels que la synergie de la combinaison et l'activité inventive, sont plus faiblement remplis (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 – Respect des critères de brevetabilité du kit mis au point par l'entreprise *Scancell*.

CRTIÈRE DE BREVETABILITÉ	RESPECTÉ ?
Invention	+
Nouveauté	+/-
Activité inventive	+/-
Application industrielle	+

Il faut donc opérer un choix qui réponde aux besoins et attentes de la future entreprise *Scancell* ; si nous optons pour le brevet il s'ensuit inévitablement une divulgation de l'invention en contrepartie d'un monopole légal temporaire mais si nous optons pour le secret nous ne pourrions pas bénéficier d'un droit d'exclusivité légal mais bien de fait (De Brabanter 1980, p. 59).

Si au départ, nous penchions spontanément pour le brevet, le processus de décision de protection pour notre projet a été long et réfléchi. Néanmoins, lorsqu'une nouvelle entreprise comme *Scancell* arrive avec un produit innovant, elle doit poser un choix entre le brevet ou le secret. Une analyse complètes des avantages et inconvénients de chaque régime est donc nécessaire avant de poser tout choix stratégique en matière de gestion de l'innovation.

Premièrement, dans le cas du choix du brevet plusieurs démarches sont nécessaires. Tout d'abord la demande de celui-ci suivi généralement de l'obtention du brevet. Les démarches nécessaires peuvent être coûteuses et longues. De plus, dans le cas du choix de la protection par brevet, il sera également nécessaire d'analyser les autres marchés potentiels, hors Belgique, où une protection sera également nécessaire, augmentant d'autant les différentes démarches et donc les coûts.

Secondement, il y a le secret. Le secret possède plusieurs inconvénients mais aussi des avantages. Tout d'abord, il est utile de rappeler que le secret ne nous donne qu'une protection fragile qui peut tomber dès la première divulgation. Dès lors, il faudra faire attention aux informations divulguées lors du démarchage de client et se protéger de la meilleure manière contre la divulgation d'information secrètes (Neven et al 2010, p. 66). Il faudra donc mettre une multitude de différentes mesures pratiques et légales en place pour diminuer le risque le plus possible.

Ensuite, dans le cas de la divulgation du secret, l'entreprise devra toujours apporter la preuve qu'elle détenait ce secret (De Brabanter 1980, p. 60). Pour se protéger d'une éventuelle demande de brevet concernant la même invention, une preuve légale possible

est la procédure proposée par l'i-DEPOT mis en place par l'Office Benelux de la propriété intellectuelle (OBPI n.d.).

Néanmoins, ces inconvénients sont contrebalancés par des avantages cruciaux pour notre entreprise. Premièrement, comme évoqué ci-dessus, lorsque l'entreprise pose le choix de garder l'invention secrète, elle peut se baser sur plusieurs législations pour faire respecter son secret (De Brabanter 1980, pp. 59-61).

Deuxièmement, malgré les coûts engendrés par les mesures de protection du secret, un brevet reste plus cher que le secret car le brevet est accompagné de taxes annuelles et ce dans chaque pays pour lequel le brevet a été déposé (Neven et al 2010, p. 66).

Troisièmement, si toutes les mesures de protection tant légales que pratiques sont appliquées et respectées, l'avantage est que le secret d'affaires n'est pas limité dans le temps, contrairement au brevet qui est limité à une période maximale de 20 ans (Neven et al 2010, p. 67). Il n'est pas toujours possible de garder le secret sur le long terme mais tant que le secret d'affaires n'est pas divulgué *Scancell* bénéficie d'un avantage concurrentiel sans devoir divulguer les détails techniques de l'invention contrairement à l'obligation de divulgation découlant du brevet (Neven et al 2010, p. 67).

Enfin, il sera difficile de garder le secret sur le long terme, mais comme nous l'expliquons dans la section R&D, nous comptons encore améliorer les tests actuels. Il n'est donc pas nécessaire d'un point de vue stratégique de partager et divulguer des informations sur nos tests pour une demande de brevet vu que ces tests doivent encore être améliorés. Il ne faut pas risquer qu'un concurrent parte de notre brevet pour protéger des améliorations qui par la suite nous bloquerons dans notre processus de développement. Il est donc avantageux pour *Scancell* de garder secret toutes les informations tant que les derniers développements concernant la personnalisation ne soient pas terminés.

Pour conclure, nous pouvons dire qu'en conséquence de la particularité de notre projet ainsi que le stade d'avancement de nos tests et les développements qui sont encore nécessaires, que nous avons opté pour la protection par le secret d'affaires. Néanmoins, ce choix est valable pour les tests tels qu'ils sont actuellement. En effet, dans le cadre de la recherche et développement, nous nous pencherons sur les qualités quantitatives de nos tests. Selon nous, cette caractéristique future de nos tests est une réelle plus-value, et surtout une innovation qui mérite plus d'être protégée par un brevet.

4.5 Autres protections juridiques

4.5.1 Exploitation du produit développé chez *Celyad*

4.5.1.1 Hypothèse 1 : le produit est breveté par *Celyad*

Nous avons vu que l'invention est brevetable et donc afin de parer à toute éventualité nous avons analysé quels moyens s'offraient à nous pour exploiter l'invention malgré tout en partant de l'hypothèse que *Celyad* décide finalement de breveter l'invention mise au point par Charlotte Bertrand lors de son stage. *Celyad* pourrait en tant que titulaire du brevet décider d'exploiter seul le brevet - ce qui est peu probable et profitable pour eux - ou de confier l'exploitation de ce brevet à une entreprise tierce, comme *Scancell*. Pour qu'on puisse exploiter un brevet appartenant à *Celyad*, ou toute autre entreprise il est nécessaire d'en avoir le droit, soit à travers une cession du brevet, soit grâce à une licence, exclusive ou non, octroyée par l'entreprise titulaire.

A. Licence

- *Définition*

La notion de licence est relativement large et aucune disposition légale ne la définit (De Gryse 2003, p. 12). Il est donc nécessaire de se tourner vers la doctrine ou la jurisprudence. De manière simplifiée, on peut considérer qu'une licence est un contrat par lequel le propriétaire du droit intellectuel octroie à un tiers le droit d'utiliser ce droit, souvent moyennant une contreprestation, par exemple sous la forme d'un prix fixe ou variable (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 19). Le licencié obtient par ce biais un droit personnel d'exploitation alors que le titulaire du brevet en reste titulaire, ce qui différencie la licence de la cession (Remiche & Cassiers 2010, p. 334).

- *Règles applicables au contrat de licence*

Dans le cadre de nos négociations avec *Celyad* nous devons rester attentifs à respecter les éventuelles dispositions légales qui pourraient s'appliquer afin de mener les négociations le plus efficacement possible.

En droit des obligations, les licences se situent dans la catégorie des contrats *sui generis* (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 7). qui, à la différence des contrats nommés comme la vente ou le bail, ne font pas l'objet d'une définition légale ni de dispositions légales (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 7). Une multitude de dispositions peuvent alors s'appliquer (De Gryse 2003, p. 15).

Tout d'abord, il faut se conformer à certaines règles découlant du socle de règles générales mis en place par le droit des obligations, tout en tenant compte de la jurisprudence et de la doctrine spécifique (De Visscher 2003, p. 50 ; Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 7 et 30 ; De Gryse 2003, p. 13). Les deux règles de bases à retenir lors des négociations sont l'autonomie de la volonté et le principe d'exécution de bonne foi (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 30).

Néanmoins, l'octroi d'une licence doit respecter certaines prescriptions légales prévues par le CDE (art. XI.51, CDE). Le CDE précise que les licences peuvent être octroyées en totalité ou en partie et de manière exclusive ou non exclusive (De Gryse 2003, p. 17). Notons également que le contrat de licence doit faire l'objet d'un écrit et cet écrit doit être notifié à l'Office (art. XI.51, §4, CDE). Il est essentiel que nous respections ces formalités pour nous assurer l'opposabilité et la publicité envers les tiers. Nous devons également prévoir contractuellement qui sera responsable d'accomplir ces démarches et comment le coût sera supporté (De Gryse 2003, p. 18). Il semble important de préciser, notamment dans le cadre du projet *Scancell*, que le code prévoit la possibilité d'avoir une licence non seulement sur un brevet en tant que tel mais également sur une demande de brevet (art. XI.51, CDE).

En doctrine et jurisprudence, il est généralement admis de se baser pour la rédaction et l'interprétation du contrat de licence sur le contrat de bail où l'objet du contrat sera le droit immatériel (De Visscher 2003, p. 50 ; Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 31 ; Remiche & Cassiers 2010, p. 334). Néanmoins, vu l'absence de prise de position de la Cour de cassation à ce sujet, il n'est pas possible de délivrer une réponse catégorique quant au bien-fondé et la validité de l'analogie entre les deux contrats (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 31). Une analyse de la jurisprudence peut nous éclairer à ce sujet : en effet, elle a parfois critiqué l'assimilation du contrat de licence à celui du bail et n'est pas unanime sur la question (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 31-33). De plus, les règles issues de la jurisprudence et de la doctrine s'appliquent de manière supplétive par rapport à ce qui est prévu contractuellement (De Visscher 2003, p. 49). Afin de se protéger le mieux possible d'éventuels flous juridiques (De Visscher 2003, p. 49), nous prendrons donc soin de détailler de manière exhaustive les différents droits et devoirs au sein du contrat (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 36). Les conditions prévues au sein du contrat de licence régleront la majorité de la relation entre les parties.

- *Conclusion, interprétation, exécution et fin de contrat de licence*

Lors de la conclusion d'un contrat de licence, outre les prescriptions formelles, quatre conditions classiques de validité doivent être rencontrées quant au fond : l'accord et la capacité des parties (*Scancell* et *Celyad*) ainsi qu'un objet et une cause légale à l'obligation

(art. 1108, C. civ.). Si une des conditions n'est pas respectée le contrat devra être considéré comme nul (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 37-45). Concernant les conditions de forme, comme déjà précisé ci-dessus, le CDE impose certaines prescriptions (art. XI.51, CDE).

Aucune disposition spécifique ne règlemente l'interprétation des dispositions du contrat de licence. Il est donc nécessaire de se tourner vers le droit des obligations. L'article 1156 du Code civil nous dit que : « *on doit dans les conventions rechercher quelle a été la commune intention des parties contractantes, plutôt que de s'arrêter au sens littéral des termes* » .

Nous sommes en présence d'un contrat synallagmatique, ce qui implique que les deux parties s'engagent l'une envers l'autre, chaque partie pouvant revendiquer certains droits et en contrepartie soumise à certaines obligations (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 60 ; De Gryse 2003, p. 19).

Le concédant de la licence, ici *Celyad*, a pour principale obligation, une obligation de *non-facere* (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 60). Il doit autoriser le licencié, c'est-à-dire *Scancell*, à exploiter le brevet soumis à licence (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 60). *Celyad* ne pourra donc pas agir en contrefaçon à notre encontre tant que nous exerçons nos droits conformément à ce qui a été convenu (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 60). Il faut ajouter à cette première obligation, le principe général des obligations qu'est l'exécution de bonne foi des conventions (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 61).

De la conséquence de ces deux premières obligations découle une multitude d'autres qui visent à encadrer la liberté d'action de *Celyad* et à optimiser l'exploitation par *Scancell* mais aussi d'être tenu responsable pour des circonstances affectant l'exploitation du licencié (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 61-70 ; De Visscher, 2003, p. 49 ; De Gryse 2003, pp. 19-20).

Le licencié est bien sûr également soumis à certaines obligations, notamment le paiement du prix (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 75-76 ; De Gryse 2003, p. 20). Sauf si cela est prévu contractuellement, *Scancell* ne sera pas soumis par la simple signature d'un contrat de licence à une obligation d'exploiter cette licence. Selon la présence ou l'absence de quotas de production l'obligation sera qualifiée comme une obligation de résultat ou de moyen (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 77-80). Il est fréquent que le licencié soit obligé de respecter une certaine qualité de produit (De Gryse 2003, p. 21) ainsi qu'une fourchette de prix de vente qui peut être imposé par le concédant (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 80-81). La clause de non-concurrence est une obligation d'exécution qu'on retrouve souvent à charge des licenciés (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 82).

D'autres interdictions et obligations peuvent être décidées contractuellement par les parties, tout en restant dans les limites de la loi (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 83-89 et De Gryse 2003, p. 19). Ce serait le cas par exemple, dans l'éventualité où *Celyad* pose un brevet sur les tests qui ont été développés, nous devons savoir ce qui doit obligatoirement leur être imposé pour être certain de pouvoir exploiter le brevet sans risque d'action en contrefaçon. Il est essentiel de connaître les règles d'usage pour ce genre de contrat afin de pouvoir négocier à armes égales.

Ces obligations imposées au licencié sont primordiales. En effet, si *Scancell* décide à son tour de licencier certaines inventions à des entreprises dans d'autres pays afin de faciliter l'expansion commerciale, cela ne doit pas se faire au détriment de la qualité de nos produits et il est important de garder une uniformité de prix afin de garder une image de cohérence envers notre clientèle.

Faut-il mentionner cette évidence que la fin d'un contrat de licence a lieu lorsqu'on arrive à la date d'extinction du contrat, ou qu'on y met fin prématurément suite à une annulation, une rupture ou une dissolution de celui-ci (Van Couter & Vanbrabant 2008, pp. 110-123) ? Malgré l'existence de certaines règles encadrant le contrat de licence, on peut conclure qu'une liberté relativement importante est laissée aux parties pour adapter les contrats de licences à leurs différents besoins et préférences.

B. Cession de brevet

La cession de brevet « consiste dans le transfert de la propriété du brevet ou de la demande de brevet du cédant au cessionnaire » (Remiche & Cassiers 2010, p. 363). Tout comme pour la licence, certaines conditions sont imposées par la CDE : entre vifs, par écrit, notification à l'Office (art. XI.50, CDE). Le CDE précise en son article XI.50 que la cession ne nuit pas aux droits des tiers obtenus préalablement au transfert, notamment les licences.

Pour le régime juridique, on applique celui du contrat de vente (Remiche & Cassiers 2010, p. 363). Dans le cas d'une cession, *Celyad* ne peut plus utiliser la technologie protégée par le brevet au risque d'être coupable de contrefaçon (Remiche & Cassiers 2010, p. 364).

4.5.1.2 Hypothèse 2 : *Celyad* garde le produit sous forme de savoir-faire

L'hypothèse la plus probable que nous formulons à la suite de nos différentes rencontres avec les responsables de cette société, est que *Celyad* ne brevète pas les tests qui ont été développés et que donc ceux-ci soient considérés comme du savoir-faire de

l'entreprise. Tout comme pour le brevet, il est possible d'exploiter et de valoriser un savoir-faire et donc de le transférer à une autre entité juridique par cession ou licence. Ici également, des instruments légaux spécifiques font défaut (De Gryse 2003, p. 38). La cession fonctionne de manière identique dans les deux hypothèses.

La licence de savoir-faire consiste en un contrat par lequel une des parties permet à l'autre partie d'utiliser une information secrète qu'elle est la seule à détenir, souvent à condition d'une contreprestation (De Gryse 2003, p. 38).

Parce qu'ils se basent principalement sur les obligations découlant des articles 1134 et 1135 du Code civil (De Gryse 2003, p. 38), le régime juridique pour les licences de savoir-faire se rapproche de celui du brevet (De Visscher 2003, p. 72), à l'exception de certaines règles spécifiques au droit des brevets d'invention qui ne s'appliqueront pas (Willems & Van Parys 2014, p. 302). La différence principale est que le savoir-faire n'est pas considéré comme un droit de propriété intellectuelle (Van Couter & Vanbrabant 2008, p. 13 ; De Visscher 2003, p. 72).

Il est donc encore plus important de délimiter ce qui est considéré comme l'information secrète transmise entre *Celyad* et *Scancell* (De Gryse 2003, p. 38). En effet, contrairement à la licence de brevet, ici le secret et le maintien de ce dernier jouent un rôle prépondérant (De Gryse 2003, p. 39). Il semble essentiel dans ce type de contrats de prévoir explicitement les conditions à respecter pour maintenir le secret (De Gryse, 2003, p. 39). Une clause de dommages et intérêts au profit de *Scancell* peut être prévue pour s'assurer de la bonne exécution du contrat et le maintien du secret par *Celyad* (De Gryse 2003, p. 39).

Insistons également sur le fait que, tout comme pour les licences de brevet, le droit de la concurrence peut entrer en jeu et limiter l'autonomie de la volonté lors de la rédaction du contrat ou son exécution (De Visscher 2003, p. 72 ; Willems & Van Parys 2014, p. 302). En effet, la licence de savoir-faire est soumise au règlement (CE) 772/2004 de la Commission du 27 avril 2004 (Kaesmacher et al 2010, p. 380).

4.5.2 Protection de l'identité de *Scancell*

4.5.2.1 Dénomination sociale et nom commercial

La dénomination sociale d'une entreprise doit être différente de toute autre société. Dans le cas de possibilité d'erreur ou si une dénomination est identique il est possible de réclamer des dommages et intérêts (art. 65 Code des sociétés). La dénomination sociale choisie pour notre entreprise est *Scancell* SPRL et sera utilisée dans toute la documentation officielle : publications, statuts, contrats, etc.

Le nom commercial que nous utiliserons est *Scancell*. C'est celui que nous utiliserons dans nos relations commerciales avec les clients, fournisseurs et partenaires. Autrement dit, c'est le nom que nous utiliserons dans la vie des affaires. Pour prouver le premier usage du nom commercial, il est possible de l'enregistrer à la Banque-Carrefour des Entreprises (SPF Economie 2016). Le nom *Scancell* évoque notre activité de base, l'analyse de cellules (« *scan cell* »), mais aussi une volonté de supprimer (« *cancel* ») un risque nocif pour les patients dans le combat de l'humain contre les maladies.

Le nom commercial et la dénomination sociale servent traditionnellement à distinguer les entreprises alors que la fonction d'une marque est de distinguer les produits ou services de différentes entreprises. Mais il n'est pas impossible d'utiliser son nom commercial comme marque.

4.5.2.2 Marque

La marque possède une triple fonction (Cornu 2007, pp. 9-11). Tout d'abord, elle doit être distinctive, c'est-à-dire permettre aux clients de différencier les produits et services des différentes entreprises. Ensuite, et cela est important pour nous, elle a une fonction de qualité, qui est une de nos valeurs de base. La marque permet aux clients de s'assurer que les produits de notre marque respectent bien la qualité issue de notre expertise. Enfin, la marque peut être utilisée dans un but publicitaire lors d'actions marketing, de conférences et salons à thématiques spécialisées par exemple.

La marque peut être exprimée de différentes manières : soit verbale, soit figurative soit via une forme soit par une combinaison de plusieurs manières, on dit alors que c'est une marque complexe. Afin de transmettre une image de qualité, nous comptons déposer la marque représentant notre package de trois tests, sous le nom de Telocell. Ce qui est important dans cette marque est le mot et sa prononciation ; nous n'attachons pas prioritairement d'importance à un logo, à des couleurs spécifiques ou à une forme tridimensionnelle.

La protection de la marque peut se faire à plusieurs niveaux. On peut choisir de la protéger pour tout le Benelux, ou sur l'ensemble du territoire de l'Union Européenne. Un instrument légal de référence règle la situation sur chaque territoire (Convention Benelux en matière de propriété intellectuelle, du 25 février 2005 et le Règlement (CE) n°207/2009). Les deux instruments reprennent les mêmes conditions de validité pour une marque : elle doit être distinctive, licite et disponible. Selon nos recherches, la marque Telocell remplit ces différentes conditions.

Vu notre volonté de nous développer en dehors de la Belgique, la protection par un dépôt communautaire nous semble le choix le plus adéquat. De plus, la différence de prix n'est pas rédhibitoire, le dépôt d'une marque Benelux étant de 240 € alors qu'une marque communautaire coûte 900 €.

Il faut également que la marque soit protégée dans la classe correspondante. L'Office de l'Harmonisation dans le Marché Intérieur (OHMI) propose 45 classes différentes en fonction des secteurs. Nos produits se retrouvent au sein de la classe 5 et les services (détection en nos laboratoires) au sein de la classe 42. Selon nos analyses et recherches dans les bases de données disponibles, la marque Telocell est encore disponible.

D'un point de vue pratique, nous devons déposer la demande de marque communautaire en ligne et payé la taxe de 900 €. Ensuite une procédure plus longue s'enclenchera, au cours de laquelle l'OHMI analysera différentes conditions et des tiers pourront s'opposer au dépôt. Une fois cela réalisé, nous pourrions bénéficier d'une marque enregistrée.

Ceci nous permettra d'interdire à des tiers d'utiliser notre marque pendant une période de 10 ans au terme de laquelle le renouvellement coûtera 1 350 € au niveau européen. De plus, le règlement prévoit qu'il est obligatoire d'utiliser sa marque sous peine de déchéance des droits qui en découlent (art. 15 et 51 du règlement (CE) n°207/2009).

4.6 Gestion des relations commerciales

Les relations commerciales qu'une entreprise entretient avec ses clients ou fournisseurs sont essentielles. Il est nécessaire de développer une image de l'entreprise mais aussi de baliser les relations de manière concrète. Une bonne gestion des relations commerciales passe d'abord par l'attraction de nouveaux clients et pour cela un bon marketing et des politiques précises sont nécessaires. Ensuite, il est important de soigner cette relation client à long terme, la clarté des contrats passés entre *Scancell* et les clients en est un des garants. Le même principe s'applique aux fournisseurs.

4.6.1 Marketing

Le plan marketing doit reposer sur une analyse approfondie du marché. Le marketing a pour but d'attirer le client ; pour cela, il est nécessaire de le connaître et de connaître ses besoins (Lendrevie & Levy 2014, pp. 26-29). L'analyse du marché a déjà été faite dans le deuxième chapitre [> Marché de la thérapie cellulaire]. Rappelons cependant que nos cibles commerciales principales sont les entreprises développant des produits de thérapies cellulaires, et les entreprises dites CMO ou CDMO. Ainsi, nous nous situons dans une relation dite de B2B ; les clients sont d'autres entreprises et non des particuliers.

Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons successivement une analyse à travers les leviers du *marketing-mix* ainsi que les spécificités du marketing en B2B, pour ensuite nous préciserons les intérêts d'un bon positionnement ainsi que l'utilité d'une marque dans le cadre marketing.

4.6.1.1 Marketing en B2B

Le marketing en B2B possède quelques spécificités qui le différencient du marketing dirigé directement vers les particuliers (Lendrevie & Levy 2014).

Tout d'abord, le nombre de clients est évidemment plus limité en B2B. L'autre difficulté est que les exigences de chaque client sont souvent plus variées qu'en B2C. Dans le cas de *Scancell*, la spécificité de chaque thérapie nous a poussés à proposer un test personnalisable et adapté à chaque client. Une autre conséquence du nombre réduit de clients est l'influence que peuvent avoir les clients sur la survie d'une entreprise. Dans une optique d'ouverture à d'autres marchés, *Scancell* investit donc en R&D.

Il faut également adapter son discours et sa démarche à l'entreprise : ses choix auront un impact sur le produit final qui lui est propre, d'autant plus que ces décisions sont souvent prises par un groupe de personnes. Nous devons donc nous concentrer sur l'avantage que le produit offert par *Scancell* leur propose et sur ce que cela apporte au

contrôle qualité de leur produit.

Une autre spécificité du B2B est la complexité des échanges car les clients sont plus exigeants. Cette complexité s'amenuise avec le temps et les échanges se simplifient (Lendrevie & Levy 2014). De plus, les échanges sont plus relationnels que transactionnels avec de tels clients, ce qui est avantageux pour le projet *Scancell*, qui désire avoir un échange win-win avec les clients lors de la phase 1 (service) afin d'améliorer le produit et l'adapter aux besoins des différents clients.

En B2B, deux éléments sont importants pour le client : (i) la prédominance de la technologie et des performances et (ii) le sur-mesure ou l'adaptation de l'offre au client (Lendrevie & Levy 2014). Comme nous l'avons déjà dit à maintes reprises, ce sont deux critères que remplit à merveille le produit proposé par *Scancell*. On le voit, la mise en place d'un marketing flexible et adapté est un levier essentiel dans la mise en œuvre de cette entreprise.

Le « *marketing mix* » est un outil crucial et couramment utilisé en marketing ayant pour but de définir l'offre d'une entreprise selon 4 politiques différentes - les 4P - : la politique de produit, la politique de prix, la politique de distribution et la politique de communication.

A. Politique de produit

Tout d'abord, précisons que toute offre présentée sur un marché est considérée comme un produit et cela que ce soit un service ou bien (Lendrevie & Levy 2014). C'est le marché qui donne à quelque chose, peu importe sa forme, une nature de produit (Lendrevie & Levy 2014). Dans le cadre du marketing, il faut s'intéresser à la manière dont le produit est perçu par les clients, tout en gardant en tête les caractéristiques intrinsèques du produit (Lendrevie & Levy 2014). Il faut pouvoir jouer tant sur la valeur d'usage du produit que sur la portée du signe qui le représente (Lendrevie & Levy 2014). Notre produit est un package de détection des cellules tumorales *in vitro* composé de 3 tests combinés, fiables, peu coûteux, rapides et personnalisables à la demande du client. Ici, la valeur d'usage pour nos clients, c'est que notre produit, au sens large, leur permet d'avoir des résultats plus fiables, plus rapides et moins chers que les tests existants. La valeur du signe, ce que cela représente, c'est surtout un produit leur permettant d'avoir un traitement de meilleure qualité et plus sécurisé. Mais il est clair qu'en B2B, la valeur du signe joue un rôle moindre que les produits sur un marché B2C (Lendrevie & Levy 2014).

Pour définir la valeur d'un produit, il faut tenir compte de plusieurs dimensions : l'analyse ne se limite pas seulement au produit en tant que tel.

Premièrement, il faut déterminer ce que caractérise le produit, ce qu'il apporte comme bénéfice au client (Lendrevie & Levy 2014). Dans une démarche pure de marketing, nous devons insister sur les effets avantageux pour le client, c'est-à-dire un résultat rapide et à bas prix, plus que sur les caractéristiques techniques du produit, tel que les détails du procédé scientifique. Ceci nous permettra de construire un discours clair et direct (Lendrevie & Levy 2014).

Deuxièmement, il nous faudra aborder le concept de formule-produit qui permet d'aborder la description technique du produit : composantes, processus, etc. Ce concept est important pour soutenir le discours marketing (Lendrevie & Levy 2014). Dans le cadre de *Scancell*, la caractéristique technique du produit est la fiabilité de la détection de la présence de cellules potentiellement tumorales au sein d'un échantillon.

Ensuite, l'avantage-produit, qui découle d'un des indicateurs présents, est mis en avant par les clients et fait que notre produit est différent des autres. Ici, nous pouvons affirmer nous distinguer par le prix, la rapidité et la fiabilité de Telocell. Un réel avantage est obtenu quand le produit arrive à cumuler quatre caractéristiques : une réponse à une attente réelle, un potentiel de communication, un prix acceptable et une imitation difficile (Lendrevie & Levy 2014). Quatre caractéristiques qu'il est possible de retrouver dans le produit développé par *Scancell*, comme nous l'avons exprimé dans le troisième chapitre [> 3.3 Capacités stratégiques].

Le design et le packaging peuvent également jouer un rôle important pour les clients. Dans le cadre du projet *Scancell*, il ne s'agit pas d'un élément prépondérant : notre client sera plutôt guidé par les avantages techniques et commerciaux de notre produit. Nous ne négligerons cependant pas cet aspect : nous veillerons à soigner le packaging de nos kits Telocell, et à travailler l'image déglagée par l'entreprise *Scancell*.

Enfin, il est nécessaire dans le cadre du marketing de faire attention au cycle de vie du produit qui se déroule en quatre phases : lancement, développement, maturité, déclin (Lendrevie & Levy 2014). Nous avons déjà démontré tenir compte de ces éléments par la construction d'une stratégie en trois phases.

B. Politique de prix

Nos prix sont calculés en tenant compte de plusieurs données. Un premier élément déterminant est la nécessité de couvrir nos coûts. Le prix ne dépendra pas seulement

de la marge unitaire nécessaire pour couvrir ces coûts mais également la prévision de vente en quantité. Pour cela, une analyse de l'élasticité de la demande (disponible dans l'analyse financière [> 5.6 Analyse de sensibilité]) permet de voir les variations dans la demande de notre produit en fonction de notre prix (Lendrevie & Levy 2014). De manière générale, nous avons opté pour une stratégie de coûts variables, c'est-à-dire que nous souhaitons au maximum réduire les coûts fixes propres à notre activité. De plus, les coûts variables liés à Telocell ont été diminués par l'utilisation d'une technique plus rentable : la qPCR.

Le prix du produit a été fixé à 900 € lors de la phase de service et 1 000 € lors de la vente de kits, nous assurant une marge brute d'exploitation confortable de 55% du chiffre d'affaires.

Evidemment, la politique de prix peut être utilisée comme un outil marketing en adoptant, par exemple une politique tarifaire dégressive pour les achats importants ou les clients les plus réguliers (Lendrevie & Levy 2014). Différents moyens peuvent être utilisés pour pratiquer cette ristourne, directement ou postérieurement, suite à un calcul sur une période donnée. Dans le cadre du projet *Scancell*, nous envisageons de modifier le prix de base en fonction du nombre de tests commandés en phase 1 puis de kits achetés en phase 2 par nos différents clients. Cette réduction se fera en fonction d'un nombre minimum de commandes à réaliser pour une période de trois mois et sera déduite de leurs prochains achats.

Notons enfin que, dans le cadre de la fixation du prix, il est important de garder en tête l'influence que cela peut avoir par rapport aux concurrents, au marché et aux clients. Ainsi, nous envisageons de diminuer le prix de vente de notre produit d'environ 20% une fois que la concurrence deviendra plus intense.

C. Politique de distribution

La distribution variera en fonction de la phase de développement de l'entreprise. Lors de la phase stratégique 1 (service), nous l'avons dit, un sous-traitant sera chargé d'acheminer les échantillons de cellules des clients directement dans nos laboratoires. Le coût du transport sera inclus dans le prix général prévu avec le client. L'analyse sera réalisée dans nos locaux et les résultats interprétés seront transmis par réseau électronique aux clients. Nous serons donc dans le cadre d'un circuit direct client-producteur.

Dans la deuxième phase de commercialisation, nous proposerons alors des kits qui seront produits par un sous-traitant. Malgré tout, la vente se fera directement par

Scancell, qui jouera le rôle de distributeur. Pour rappel, après production, les kits Telocell doivent revenir dans nos laboratoires pour y incorporer le contrôle tumoral. Nous serons alors dans le cadre d'une vente directe, nos vendeurs propres iront directement chez le client dans le but de le convaincre et de faire connaître au mieux nos produits. Il est à envisager qu'une fois le produit suffisamment connu et réputé, la force de vente directe ne sera plus nécessaire et les clients nous contacteront directement pour de nouvelles commandes, ce qui a l'avantage de pouvoir utiliser nos forces de ventes pour le développement de nouveaux marchés.

D. Politique de communication

Les secteurs des biotechnologies et de la thérapie cellulaire sont à l'heure actuelle des milieux relativement fermés. Pourtant, nous sommes dans une période idéale pour approcher les acteurs de la thérapie cellulaire, étant donné que peu d'entreprises sont complètement établies sur le marché et qu'elles sont donc à la recherche de partenaires de confiance. Pour établir une communication efficace avec ces entreprises, nous pouvons utiliser différentes techniques de communication. Il est important de choisir les canaux que nous désirons utiliser afin de couvrir notre cible et de valoriser notre message. Par exemple, les médias « grand public » de type télévision ou radio ne sont pas pertinents, ils ne touchent pas notre cible et ne serviraient que peu à valoriser notre message.

Pour atteindre nos futurs clients, nous mettrons en place différentes stratégies :

— *Prospection publique*

Une promotion de l'entreprise *Scancell* à travers des revues spécialisées, des salons, congrès et conférences sera entreprise. En effet, une démarche proactive vis-à-vis du secteur est nécessaire à la mise en place d'une collaboration. Les porteurs de projet représenteront le premier contact avec le client.

— *Prospection intermédiaire, via notre CRO partenaire*

Il est également envisageable que, grâce à notre relation privilégiée avec notre laboratoire partenaire, nous puissions convaincre certains de leurs clients d'établir également une relation commerciale avec notre entreprise.

— *Agent commercial employé*

A partir de juillet 2017, nous avons prévu de recruter un collaborateur (employé) commercial, cette personne possédera de l'expérience dans le milieu des biotechnologies et de la thérapie cellulaire. Elle pourra s'occuper de marketing direct en contactant tous nos clients et leur proposant des rendez-vous, elle portera également le message que l'entreprise veut véhiculer et convaincra ainsi le client.

— *Communication médias*

Enfin, dans le monde actuel, il semble nécessaire de passer par le média de l'internet. En effet, internet reste un canal important à utiliser à bon escient. Un

page de qualité permettra aux clients de s'informer sur l'équipe managériale, les produits, la manière de les commander, etc. Ce site doit pouvoir être trouvé rapidement et doit être clair et structuré, bien référencé pour faciliter la recherche du client et lui délivrer un message clair.

4.6.2 Relations contractuelles avec les tiers

Dans le cadre de nos négociations tant avec nos futurs clients qu'avec d'éventuels partenaires pour la production ou l'utilisation de laboratoires, nous devrons partager certaines informations confidentielles. Ces informations seront de différents ordres : savoir-faire, clients, informations financières, etc. Dans le cas des employés, le sujet a déjà été abordé concernant dans le cadre de la protection du savoir-faire par la loi (art. 17, 3°, LCT), néanmoins l'exposé ci-dessous est applicable au contrat de travail, tant que la clause respecte la législation en vigueur pour le contrat de travail.

Pour assurer la poursuite de nos activités en toute sérénité il est nécessaire de se prémunir de toute divulgation ou utilisation d'informations secrètes. La protection se fait grâce à plusieurs instruments et à plusieurs niveaux. Dans certaines situations, pour limiter le risque de concurrence, le régime légal sera suffisant, dans d'autres, des contrats ou des clauses insérées dans ceux-ci joueront le rôle de garde-fou. Nous verrons que, le plus souvent, les deux peuvent être associés pour une protection optimale.

Le droit des contrats entre également en compte lorsqu'on établira des relations de vente avec nos clients et nos différents fournisseurs.

4.6.2.1 Confidentialité

Dans le cadre de nos relations avec le futur laboratoire partenaire ainsi qu'avec l'entreprise à qui nous sous-traiterons la production des kits, il est important de se prémunir de toute divulgation d'informations considérées par *Scancell* comme secrètes. Au sein de nos différents accords, il est donc préférable de prévoir des clauses de confidentialité ou même un contrat de confidentialité, c'est-à-dire un contrat par lequel une des parties s'engage en contrepartie de la réception d'une information, à ne pas divulguer ou utiliser cette information confidentielle (Andries 2010, p. 367). Ce type de contrat empêchera les tiers avec qui nous contractons et à qui nous communiquons certaines informations confidentielles de les utiliser ou de les divulguer.

La confidentialité entre en jeu à toutes les étapes du contrat : lors des négociations, pendant l'exécution et après la fin du contrat (Foriers 2006, p. 438). Les clauses de confidentialité peuvent être utilisées pour un large éventail d'informations, mais dans

le cadre du projet *Scancell* nous nous intéressons surtout à la protection du savoir-faire et de nos différentes données scientifiques liées au projet (Foriers 2006, p. 439).

Comme nous l'avons brièvement évoqué ci-dessus, des contrats ou clauses de confidentialité peuvent être associés à des prescriptions légales (Foriers 2006, p. 440). Relevons notamment le principe de bonne foi dans l'exécution des contrats, consacré par l'article 1134, alinéa 3 du Code civil.

Afin de respecter le devoir d'information qui s'impose aux parties contractantes, les informations confidentielles sont souvent communiquées lors de la phase de négociation (Foriers 2006, p. 442 ; Jacquemin 2014, p. 146). L'obligation de confidentialité, conséquence du principe de bonne foi, est le pendant de ce devoir d'information (Foriers 2006, p. 441).

Pour convaincre un laboratoire partenaire pour la production de notre service en phase 1, nous devons lui communiquer des informations scientifiques précises pour prouver la viabilité de notre projet et il ne serait pas suffisant de se contenter de l'obligation issue de l'article 1134 du code civil pour se prémunir de tout danger. Il est donc nécessaire de passer par une protection contractuelle de la confidentialité.

Au sein du contrat ou de la clause de confidentialité il est nécessaire de définir quelles informations doivent être considérées comme confidentielles ainsi que le(s) moyen(s) de communication à utiliser (Willems & Van Parys 2014, p. 304 ; Jacquemin 2014, p. 147 ; Neven et al 2010, p. 80). La pratique préconise une définition des informations confidentielles relativement large, afin d'éviter tout problème d'interprétation (Foriers 2006, p. 442). Ensuite, toutes sortes de précautions peuvent être prises afin de limiter les risques (personnes liées, objectif de collaboration, procédure de destruction d'information, sanction conventionnelles, etc). Néanmoins, un des facteurs importants reste la confiance en son partenaire co-contractant (Foriers 2006, pp. 444-448 et 452 ; Neven et al 2010, p. 80).

Il est important également en cas de convention de confidentialité de prévoir la durée de l'accord (Foriers 2006, p. 448 ; Jacquemin, 2014, p. 154). En effet, tout contrat à durée indéterminée peut être soumis, après un préavis raisonnable, à résiliation par une des parties au contrat (Foriers 2006, p. 448). La confidentialité peut également jouer après la rupture ou dissolution du contrat. *Scancell* devra prévoir quelles sont les limites et conditions de cette continuité post-contrat (Foriers 2006, p. 449 ; Jacquemin 2014, p. 146).

4.6.2.2 Non-concurrence

Nous avons pu voir ci-dessus que, concernant les partenaires commerciaux et techniques, la clause de confidentialité permet de limiter la concurrence étant donné que les parties se voient interdire non seulement de divulguer l'information mais également d'utiliser celle-ci.

Dans tous les cas, la clause de non-concurrence doit être en accord avec l'article II.2-4 du Code de droit économique (De Vreese & J. Willems 2015, p. 272) ; c'est dans cet article que la liberté de commerce et d'industrie trouve son fondement en droit belge. La clause de non-concurrence, prévue expressément dans ce même article vient donc limiter la liberté de concurrence qui découle de celle-ci (Neven et al 2010, p. 92). Nous pouvons observer plusieurs limitations en matière de concurrence, notamment avec l'interdiction de concurrence déloyale ou encore dans la réglementation concernant le contrat de travail et ou d'agent commercial (Neven 2010, p. 92 ; De Vreese & J. Willems 2015, p. 272). Certains tempéraments à cette clause sont nécessaires : limitation de l'objet, de la durée et de l'espace (Serra 1970, p. 15 ; De Vreese & J. Willems 2015, p. 272). En effet, de telles clauses viennent restreindre la liberté de commerce et d'industrie ou la liberté de travail de la partie s'engageant à une telle clause (Serra 1970, p. 15 ; De Vreese & J. Willems 2015, p. 272). La Cour de cassation nous apprend que ces libertés de commerce et d'industrie sont d'ordre public et que donc la sanction en cas de non-respect est la nullité absolue de la clause (Cass., 13 septembre 2001, *RW*, 1991-92, p. 882). Malgré tout, récemment, la Cour de cassation penche plutôt pour une modération de la clause de non-concurrence dans les cas où elle ne respecte pas suffisamment les limites de temps, d'objet et d'espace (Cass., 23 janvier 2015, *DAOR*, 2015, liv. 3, p. 18). En conséquence, il est donc conseillé à des entreprises comme *Scancell* d'insérer de telles clauses dans leurs contrats et de prévoir cette modération par le juge de manière expresse dans le contrat (De Vreese & J. Willems 2015, p. 273). En effet, une telle clause permet de s'assurer que le juge ne prononcera pas d'office la nullité de la clause mais se bornera à l'adapter à des limites plus adéquates, et donc la clause ne perdra pas tout effet voulu par les parties.

Concernant l'interdiction de concurrence découlant du contrat de travail, plus précisément l'article 17 de la LCT, nous renvoyons à la section concernant la protection du secret par le droit du travail.

Néanmoins, il est possible d'ajouter une clause de non-concurrence supplémentaire au sein du contrat de travail (Gilson et al 2012, p. 191). Par une telle clause, un employé, ouvrier ou agent commercial s'engage à ne pas exercer d'activité similaire en utilisant les connaissances particulières qu'il aurait accumulées (Gilson et al 2012, p. 191).

Trois conditions d'existence sont nécessaires : cela doit viser une activité concurrente, il faut un risque que le travailleur porte préjudice à son ancien employeur et le travailleur doit avoir acquis des connaissances particulières chez son ancien employeur (Gilson et al 2012, p. 192). La Cour du travail de Liège a considéré que ces trois conditions étaient essentielles à la qualification d'une telle clause en non-concurrence (C. trav. Liège, 8 janvier 2004 ; *JTT*, 2004, p. 331). Selon la jurisprudence de la Cour de cassation, ces trois conditions cumulatives doivent être réalisées au plus tard à la fin de la relation de travail dont fait partie la clause (Cass., 7 mai 1984 ; *JTT*, 1984, p. 362).

Certaines conditions de validité s'imposent également. Tout d'abord les articles 65 et 86 LCT exigent, sous peine de nullité, un écrit. De plus, de telles clauses sont dépendantes de la rémunération brute annuelle de l'employé (Gilson et al 2012, p. 195).

Concernant plus spécifiquement l'agent commercial, le régime est malgré quelques différences relativement identique mais certaines différences existent (articles 104 et suivants, LCT).

Il n'est pas possible, au regard du droit européen, de fausser la concurrence par des accords entre entreprises (art. 101, Traité sur le fonctionnement de l'Union européenne (TFUE)). Un éventuel accord de non-concurrence avec une entreprise tierce semble donc difficile. Néanmoins, l'article 101 du TFUE prévoit que sous certaines conditions des possibilités sont ouvertes. Il faudra analyser lors de nos négociations avec les entreprises partenaires si la relation répond aux conditions de l'article 101 du TFUE.

4.6.2.3 Contrats clients et fournisseurs

Dans le cadre de nos relations avec nos clients et nos fournisseurs, des contrats seront également nécessaires. Ils ne posent pas de réels problèmes au niveau juridique : en effet, il suffit de se reporter aux législations concernant le contrat de service pour la relation avec nos clients lors de la phase 1 et le contrat de vente lors de la phase 2. Il est évident que les développements concernant la confidentialité ou la non-concurrence sont également d'application au sein de ces contrats.

La relation entre nos fournisseurs de matières premières peut dans certains cas être plus compliquée et impliquer des négociations. Tout d'abord, afin d'éviter tout retard dans les livraisons nous comptons imposer à nos fournisseurs des pénalités financières en cas de retard trop important (contrat « *back to back* »). Cette mesure permettra de limiter les risques de retard de livraison et leurs conséquences dans la production. De plus, deux de nos fournisseurs principaux sont *Integrated DNA Technologies* (IDT) et *Roche*. Selon les conditions générales de vente tant de *Roche* que d'*IDT*, les produits que

nous commandons chez eux et utilisons pour l'instant dans nos tests peuvent être utilisés uniquement dans le cadre de la recherche et développement. Cette problématique relève du droit des contrats. Nous ne désirons pas être limité par cette condition du contrat de vente qui restreint l'utilisation de leurs produits dans un cadre pur de R&D. Nous devons donc entrer en négociations avec ces deux entreprises pour pouvoir supprimer cette condition. Cette suppression se fera certainement en contrepartie d'un avantage pour les parties adverses, probablement sous la forme d'un prix de vente supérieur au prix d'initial. Nous sommes confiants de l'issue positive de ces négociations étant donné que ces deux entreprises ont intérêt à fonctionner avec nous vu l'augmentation de leur vente qui s'en suivra.

4.7 Gestion administrative

La gestion administrative d'une société s'opère à différents moments : d'abord lors de la fondation de la société, les fondateurs devront se diviser les parts, investir dans la société et se mettre d'accord sur la forme à choisir. Une fois fondée, la société devra être gérée et grandir. Pour cela il est nécessaire de mettre en place une gestion au jour le jour mais aussi une gestion plus ponctuelle mais tout aussi importante à travers le conseil d'administration. Enfin, pour grandir il est également nécessaire d'engager du personnel et de le gérer de manière optimale. En effet l'équipe de base et un excellent produit ne suffisant pas, la gestion des ressources humaines est un point essentiel pour la croissance de l'entreprise (Peretti 2002). Les techniques de gestion de ressources humaines sont multiples et servent à répondre aux différents défis auxquels les entreprises doivent faire face (Peretti 2002).

4.7.1 Structure organisationnelle

Le paysage du droit des sociétés en Belgique est extrêmement vaste et varié. Nous sommes en présence d'une multitude de formes de sociétés (art. 2, C. soc.).

Scancell se situe dans le secteur des entreprises de biotechnologies, et, suite à une analyse des différentes formes choisies par les sociétés actives dans les biotechnologies, nous remarquons une prédominance forte pour la société anonyme (SA), par exemple chez *Masthercell*, *Celyad*, *Novadip*, *Promethera*, *Ablynx*, *Thrombogenics*. Néanmoins, il nous semble primordial de vérifier si la SA correspond bien à nos besoins ou si d'autres possibilités nous conviendraient mieux.

Notons d'ores et déjà que nous souhaitons à moyen et long terme nous développer en tant que CRO. Il s'agit d'entreprises proposant des solutions d'externalisation de la R&D pour des entreprises actives dans différents secteurs tels le pharmaceutiques, les biotechnologies, les appareils médicaux, etc. En effet, les entreprises cherchent à externaliser certaines fonctions de la R&D pour accélérer des processus de développement qui peuvent prendre des années et pour éviter certains coûts liés à cette recherche (Harris Williams 2014).

4.7.1.1 Un contrat

Pour matérialiser la volonté de travailler ensemble il est possible de créer une société, il faut alors un acte constitutif de celle-ci, acte qui doit être passé devant un notaire. C'est une étape essentielle qui, sous certaines conditions administratives, permet à la société d'exister et d'obtenir sa personnalité juridique (art. 450, 451, 355 et 226, C. soc.). Les fondateurs de notre projet d'entreprise sont les membres porteurs du projet, c'est-à-dire,

Charlotte Bertrand, Robin Pétré et Antoine Logé. Ensemble nous formons la base de la société et signerons l'acte de constitution chez le notaire.

4.7.1.2 Un partenariat

A la base de toute constitution de société on retrouve un partenariat entre plusieurs personnes (art. 211, C. soc.). Le nombre et la dénomination des partenaires varient en fonction de la forme de société choisie. Concernant *Scancell*, les porteurs du projet sont actuellement au nombre de trois et donc le critère du nombre minimum de fondateurs et/ou actionnaires n'aura pas un rôle prédominant dans le choix futur de la forme de société.

4.7.1.3 Un capital

Chaque société est composée d'un capital social minimum. Le projet *Scancell* est un projet demandant un investissement initial important, de 165 000 €. Néanmoins pour cela il serait nécessaire d'intégrer à notre partenariat des investisseurs prêts à suivre le projet dès le commencement, étant donné que les trois porteurs de projets ne peuvent souscrire et libérer la somme de 61 500 €, capital minimum pour la constitution d'une SA. Afin d'éviter une dilution de pouvoir dès la fondation nous avons décidé de fonder la société à trois sur base d'un investissement de 12 000 € par personne. Nous voyons ici que le capital minimum joue un rôle déterminant dans notre choix final.

4.7.1.4 Titres

Le transfert de titres est plus simple au sein de la SA que dans la SPRL ou la SCRL, mais il est toujours possible pour les actionnaires d'une SA de restreindre la cessibilité des actions au sein d'un pacte d'actionnaires ou à travers d'autres moyens (art. 510, C. soc.).

Pour les différentes raisons évoquées ci-dessus et éviter une dilution rapide du capital, nous avons décidé de constituer une SPRL. Nous sommes prêts à accepter de passer d'une SPRL à une SA, si un investisseur est intéressé par notre projet mais qu'il désire passer en SA pour faciliter sa stratégie de sortie. La répartition des titres entre les porteurs du projet *Scancell* et les investisseurs se négociera au cas par cas, néanmoins les trois porteurs de projet désirent garder un certain contrôle de la société afin de pouvoir mener, le plus possible, le projet conformément à leur vision. C'est pour cela que nous désirons commencer en tant que seuls fondateurs.

4.7.2 Administration et gestion

Scancell prévoit, dans un premier temps, de constituer un conseil d'administration composé des trois fondateurs ainsi que de trois membres externes possédant une

expérience au sein du secteur des biotechnologies et si possible dans tout ce qui se rapproche du milieu de la thérapie cellulaire. Néanmoins, ces prévisions peuvent évoluer et être adaptées aux demandes et exigences de certains investisseurs.

A court terme, en ce qui concerne la gestion quotidienne, les trois porteurs de projet ont pour ambition de gérer l'entreprise eux-mêmes tout en externalisant certaines tâches à des entreprises spécialisées. A plus long terme, *Scancell* espère recruter des personnes d'expérience pour rejoindre la direction de l'entreprise et continuer son développement.

4.7.2.1 Administrateur délégué

Nous sommes tous les trois motivés par le projet de l'entreprise *Scancell* et désirons tous nous y investir et travailler pour sa réussite. Néanmoins, des contraintes de budget nous limitent dans les possibilités. Nous sommes donc arrivés à un arrangement convenant aux trois parties fondatrices. Charlotte Bertrand, sera pour commencer le seul membre de l'équipe à être engagée par l'entreprise (et ce, pendant trois mois), tandis que les deux autres travailleront également à temps plein, mais sans rémunération pendant cette période. Cette configuration a été mise en place pour « compenser » l'important travail effectué par Charlotte Bertrand chez *Celyad* en 2015-2016, une manière d'uniformiser l'investissement des fondateurs dans le projet. En contrepartie, ceux-ci posséderont un tiers des parts de la société chacun.

A terme, nous souhaitons engager un CEO externe pour permettre à notre entreprise de croître grâce à l'expertise et à la direction d'un profil d'expérience. Etant donné les coûts liés à ce recrutement, nous désirons faire appel au programme « CxO » mis en place par l'organe *Sowalfin* de la Région wallonne. Ce programme permet de recruter un profil managérial à haute valeur ajoutée grâce au réseau et au financement de la Région wallonne (Sowalfin 2015). Cette mesure est coordonnée par le *WBC Incubator*, un organisme privé de consultance en biotechnologies. Au vu du délai procédurale lié à cette mesure, Charlotte Bertrand assumera dans un premier temps le rôle d'administrateur délégué, jusqu'en janvier 2018, lorsque le nouveau dirigeant entrera en fonction.

4.7.2.2 Conseil d'administration

Le conseil d'administration joue un rôle important dans les choix que pose une entreprise et il est nécessaire de nous entourer de personnes compétentes et expérimentées pour nous suivre dans ce projet et prodiguer un avis et des idées extérieures. Pour cela, nous avons décidé de composer le conseil d'administration de la manière suivante :

- Les trois fondateurs : Charlotte Bertrand, Robin Pétré et Antoine Logé ;
- Nos coachs/mentors : Pierre Le Rigoleur, alumnus CPME et accompagnateur du projet depuis plus d'un an ; Didier Cloquet, notre coach au sein du concours 123

- GO ! et ayant une expérience dans différents secteurs dont les milieux médicaux et technologiques ; et Philippe Van der Hofstadt, expert dans le secteur des CRO ;
- Des représentants de nos investisseurs externes : *Business Angels* ou *Venture Capitalists* ;
 - Le *WBC Incubator* occupera également un siège dans le cas où la mesure « CxO » nous serait accordée.

4.7.2.3 Agrandissement de l'équipe

A partir de la phase stratégique 2, nous devons grandir à plusieurs niveaux et, pour cela, il nous semble nécessaire de faire croître la société notamment à travers le nombre de ses collaborateurs. Engager des personnes représente un coût important pour les jeunes entreprises mais est crucial pour assurer leur croissance.

Tout d'abord, nous devons recruter un technicien de laboratoire pouvant aider Charlotte Bertrand, tout d'abord dans notre activité de production (principalement en phase 1 donc), puis pour la recherche et le développement du premier produit ainsi que sur des produits permettant de nous ouvrir à d'autres marchés. Le technicien de laboratoire sera engagé en juillet 2017.

Ensuite, il sera nécessaire de recruter un collaborateur (employé) commercial qui pourra aller à la rencontre des clients et représenter la société *Scancell* et ses différents produits en Belgique ainsi que dans d'autres pays européens. Comme nous l'avons présenté, l'expansion géographique est en effet une clé de la croissance de *Scancell* en phase 2 et se fera à l'horizon 2020. Ce recrutement se fera au milieu de la phase 1, en juillet 2017, afin d'établir le maximum de contacts clients avant la mise sur le marché de notre produit sous forme de kit, ce qui correspond à la phase 2. Notons également qu'avant ce recrutement, Antoine Logé et Robin Pétré pourront prendre en charge cette mission en se limitant au territoire belge.

4.7.2.4 Rémunération

Il faut distinguer la rémunération de l'administrateur délégué, de celui du technicien de laboratoire ou encore de celui de l'employé commercial. De plus, nous postulons pour le programme « CxO » de la Région Wallonne, qui prendra en charge une partie de la rémunération du CEO recruté en 2018. Sa rémunération sera subsidiée à 75% la première année, 50% la deuxième et 25% la troisième (Sowalfin 2015). Néanmoins, à la suite de rencontres notamment au « *Mind & Market* » de 2016, nous avons appris que la procédure « CxO » était potentiellement gelée et donc, au niveau financier, nous avons prévu nos chiffres sans tenir compte de ce subside. Le CEO recruté sera rémunéré à 5 500 € brut par mois.

Charlotte Bertrand, lorsqu'elle sera administrateur délégué de l'entreprise, sera considérée comme indépendante aux yeux du droit social, tout comme Antoine Logé et Robin Pétré lorsqu'ils seront désignés officiellement en janvier 2017. Nous avons prévu, pour les trois fondateurs et co-gérants de la société, une rémunération mensuelle brute équivalente à 1 900 €. En tant que gérants de la société, ils auront le statut d'indépendants. *Scancell* ne sera donc pas amenée à payer des cotisations patronales sur leur rémunération. En tant qu'indépendants, ils doivent s'affilier à une caisse d'assurances sociale pour indépendant et payer leurs cotisations en tant que travailleurs indépendants (SPF Economie 2016) .

Ensuite, le technicien de laboratoire sera considéré comme un employé de l'entreprise, ce qui implique différents coûts. Tout d'abord le salaire, qui sera équivalent à 3 000 € bruts. A cela s'ajoutent les cotisations patronales de 32,44% ainsi que le simple et le double pécules de vacances (UCM n.d) et d'autres contributions éventuelles, soit pour l'employeur, l'équivalent par an de 55 598 €.

Enfin, l'employé commercial sera rémunéré de manière classique, c'est-à-dire avec une somme fixe, comme tout employé. En outre, des primes seront possibles en fonction de l'atteinte d'objectifs à définir. Nous avons prévu un salaire mensuel brut de 3 500 € par mois (et une voiture de société) ainsi qu'un bonus variable annuel pouvant aller jusqu'à 2 500 € bruts.

Pour nos prévisions financières, nous avons systématiquement prévu une augmentation annuelle de 3%, et ce, quel que soit le poste.

4.7.2.5 Culture de l'entreprise

Dans le cadre du développement de notre entreprise, nous voulons adopter une culture d'entreprise permettant à chaque collaborateur de donner le meilleur de lui-même. Nous croyons que nos produits et services peuvent être améliorés grâce à toutes les parties impliquées dans le processus. Dans cette optique nous voulons inculquer à nos employés et collaborateurs l'esprit de partage et de communication. Notre souhait est que l'entreprise se développe avec et grâce à ses employés et partenaires mais aussi avec ses clients. Pour cela, nous souhaitons favoriser les échanges d'informations entre les différentes personnes de l'entreprise mais aussi avec les différents acteurs liés à l'entreprise tels que les clients, les fournisseurs ou d'autres partenaires. Ceci intervient dans une de nos valeurs clés : la transparence. C'est également dans cette optique que, lors de notre phase stratégique 1 (service), nous dialoguerons un maximum avec nos clients afin de proposer un produit qui convient à leur attente. Il est important, à nos yeux, que chaque employé fasse de son mieux pour proposer un travail de haute qualité,

travail qui aboutira en un produit de haute qualité pour nos clients finaux.

Dans cette optique, nous pensons qu'il est nécessaire que chaque employé puisse continuer à se former, pour être le plus compétent possible dans son travail et garder l'ensemble du personnel motivé. A plus long terme, nous devons engager différents employés afin de pouvoir suivre la croissance mais aussi continuer à développer de nouveaux produits ; il nous paraît important d'investir dans la formation continue de nos collaborateurs, comptabilisée pour 250 € par collaborateur par an. En effet, non seulement, la formation des employés est bénéfique pour l'entreprise, mais de plus elle répond souvent à une demande émanant des employés eux-mêmes (Peretti 2002). Pour une coordination adéquate, il est nécessaire de passer par une analyse de besoins en comparant les connaissances déjà acquises par les employés et celles qui sont ou seront nécessaires dans le futur (Peretti 2002).

Analyse financière

5.1	Evolution des revenus	184
5.2	Dépenses	186
5.2.1	Coûts variables	186
5.2.2	Coûts fixes	187
5.2.3	Investissements	188
5.3	Financement	190
5.3.1	3F - <i>Fools, Friends & Family</i>	191
5.3.2	Emprunt bancaire	192
5.3.3	<i>Business Angels</i>	192
5.3.4	<i>Crowdfunding</i>	193
5.3.5	Aides publiques.	194
5.4	Résultats et indicateurs de performance.	195
5.4.1	Rentabilité.	195
5.4.2	Trésorerie	196
5.5	Valorisation.	198
5.6	Analyse de sensibilité	202
5.6.1	Prix des kits	202
5.6.2	<i>Royalties Celyad</i>	203
5.6.3	Date de mise sur le marché des kits	204
5.7	Analyse de risque	205

Une étude de faisabilité ne serait bien sûr pas complète sans une prévision financière à plusieurs années. Celle-ci n'est cependant que la traduction chiffrée du plan d'action énoncé précédemment (Janssen 2009). Cet exercice permet cependant de s'obliger à vérifier tous les détails composant le business model, et à s'interroger sur la pertinence financière des hypothèses posées auparavant.

Notre plan financier débute au 1er octobre 2016, date de la création de l'entreprise. Plusieurs mois de développement, de demandes d'accréditations légales et de planifications commerciales sont encore nécessaires à partir de ce moment-là avant de pouvoir proposer notre produit à nos clients. Le plan prévoit trois années complètes d'exercice fiscal, donc trois ans et trois mois en tout avec la fin de 2016.

Après avoir analysé les différents revenus et dépenses pour les prochaines années, et donc leur traduction comptable, nous cernerons le besoin en financement et notre plan concret pour le rencontrer. Ensuite, nous analyserons brièvement, via une étude de sensibilité, l'importance de certains paramètres sur notre santé financière.

5.1 Evolution des revenus

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre sur l'opportunité, le marché de la thérapie cellulaire est un marché très récent, et à l'heure actuelle, un seul médicament développé en Belgique a été commercialisé : le Chondroselect de *Tigenix*, dont la distribution a été aujourd'hui cédée au suédois *Sobi* (l'Echo 2014). Dans les années à venir, plusieurs produits en phase IIa ou III d'essais cliniques devraient arriver à commercialisation.

Dans la pratique néanmoins, la date de commercialisation de ces produits pourrait varier fortement suivant les autorisations accordées par l'EMA, pouvant concrètement provoquer des sauts de continuité dans nos prévisions de revenus. Ces sauts de continuité pourraient également provenir de la présence de partenariats avec de nouveaux clients. En effet, le caractère spécifique de nos tests implique que ces derniers soient choisis pour l'entièreté de la production locale d'un traitement, sans quoi cela compliquerait fortement les processus internes de ces entreprises et les validations légales.

Nous avons cependant considéré notre augmentation de clientèle comme linéaire, en supposant que les entreprises de thérapie cellulaire devraient faire de même, petit à petit, pour toucher de plus en plus de clients en partant de zéro. De plus, les essais cliniques, menés préalablement à la commercialisation, sont, eux, nettement plus fréquents, et avec des échantillons très variables en nombres (dix patients traités en moyenne par phase (EMA 2013)). De l'estimation réalisée dans le deuxième chapitre [> 2.2 Marché de la

thérapie cellulaire], nous obtenons le figure d'évolution des revenus suivante (Figure 5.1)

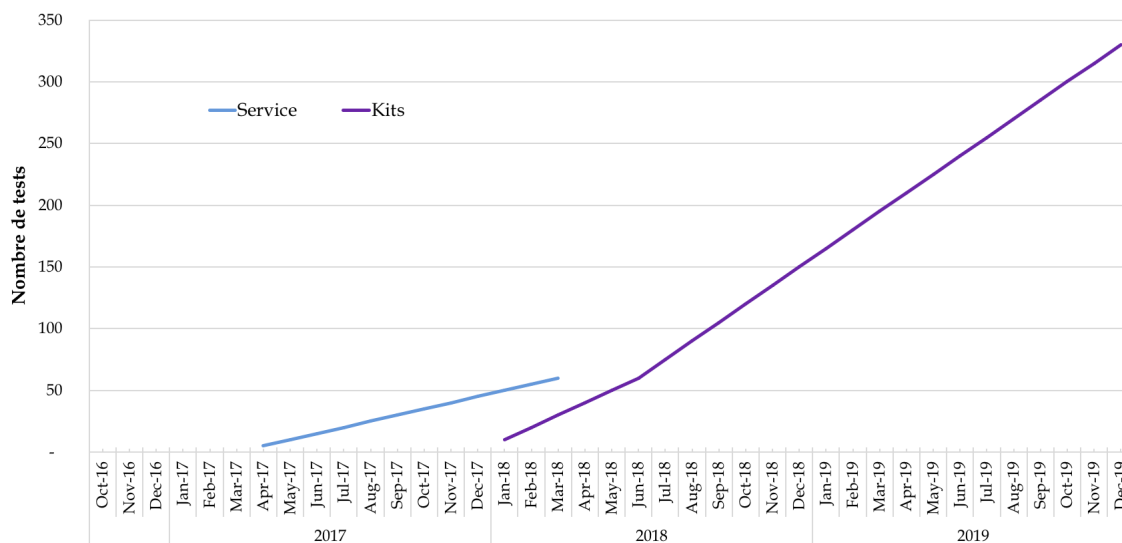


FIGURE 5.1 – Nombre de produits vendus par mois, par catégorie, entre la création de l'entreprise et décembre 2019.

L'évaluation de nos revenus a été faite non seulement sur cette observation de l'évolution du marché, et de l'augmentation du spectre de patients dans les années à venir, mais aussi sur notre développement à l'international, en Europe, à partir de la phase 2, ainsi que sur les rencontres effectuées avec de potentiels clients qui semblaient ouverts à une collaboration (*Celyad, Bone Therapeutics, Promethera*).

L'évolution du nombre d'analyses (le service) effectuées par mois se base sur l'évolution de notre part de marché des analyses nécessaires lors des essais cliniques, ainsi que sur la quantité de recherches réalisées en hôpital (pour plus de détails, voir le deuxième chapitre [> 2.2 Marché de la thérapie cellulaire]).

Concernant le prix du produit, il a été fixé à 900 € par service réalisé et 1 000 € pour le kit en première année de commercialisation (2018), ce qui nous assurera une marge brute d'exploitation confortable par rapport à nos dépenses (voir section suivante) soit 55% du chiffre d'affaires. Nous supposons ensuite que l'arrivée de la concurrence nous oblige dans les années suivantes à réduire notre prix de vente de 20%. La politique de prix a été développée dans le quatrième chapitre [> 4.6 Gestion des relations commerciales].

Notre chiffre d'affaires évolue donc de manière croissante (Figure 5.2), avec deux creux constatés, le premier en avril 2018 en fin de phase 1 lorsque nous commencerons la production des kits et le deuxième en janvier 2019, où nous nous attendons à devoir réduire nos marges bénéficiaires à cause de la concurrence accrue.

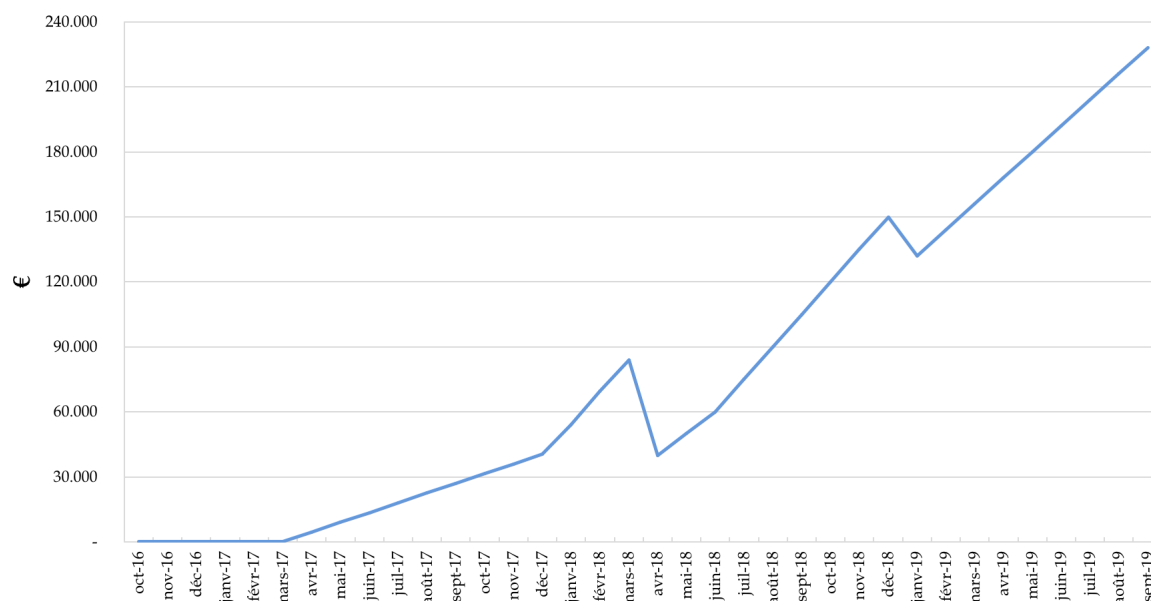


FIGURE 5.2 – Evolution du chiffre d'affaire mensuel entre la création de l'entreprise et octobre 2020.

5.2 Dépenses

Trois types principaux de dépenses doivent être comptabilisées pour notre entreprise : les coûts variables, considérés comme linéairement proportionnels au nombre de services effectués et kits produits (c'est-à-dire que dans le plan financier, nous ne considérons pas d'économies d'échelle), les coûts fixes, relatifs à la gestion opérationnelle de l'entreprise, comme les employés, le marketing, etc. et les investissements, dépenses à plus long terme (plus d'un an) pour l'entreprise, telles que la machinerie, les frais de création de l'entreprise, le dépôt de la marque, etc. Comptablement, ces dernières dépenses sont amorties sur plusieurs exercices comptables, c'est-à-dire, réparties sur la durée d'utilisation probable du bien (IPCF 2011).

5.2.1 Coûts variables

Le coût variable principal, l'achat des constituants du package, nous revient à 223,47 € par package (détails en annexe [> Annexes financières]), soit 21% du prix de vente de nos tests auquel nous devons ajouter des frais de création de kits en phase 2, puisque nous externalisons la production physique à une autre entreprise, qui se chargera elle de d'approvisionner chez Roche, IDT et nos autres fournisseurs habituels. Le coût total de ce kit a donc été estimé à 300 €, transport vers nos laboratoires compris [> Etude de marché].

Le transport en phase 1, entre les entreprises clientes et nos laboratoires sera quant à lui assuré par notre partenaire B&C Group, de manière bi-hebdomadaire et revient selon nos estimations à environ 25 € par trajet pour les entreprises situées dans notre zone

géographique, 40 € sinon, selon les estimations réalisées par Philippe Van Der Hofstadt de *B&C Group*, les entreprises de thérapie cellulaire étant majoritairement localisées dans les mêmes *clusters*. Le transport sera facturé au client au prix de revient.

Nous avons de plus prévu des royalties pour *Celyad*, pour la licence de la propriété intellectuelle liée aux tests développés par Charlotte Bertrand dans leur laboratoire, montant estimé à 15 % de notre chiffre d'affaires (payables annuellement), sur base de conseils prodigués par des spécialistes de la propriété intellectuelle, comme l'OBPI ou Tony Christiaens de la Maison de l'entreprise de Mons.

5.2.2 Coûts fixes

Les coûts fixes concernent principalement les frais liés à notre bâtiment, comprenant laboratoire et bureau, et aux ressources humaines.

Le bâtiment, un quatre pièces d'environ 200 m², nous coûterait environ 2500 € par mois dans la région de Gosselies (Immoweb 2016), un important pôle en biotechnologie comme nous l'avons signalé auparavant. En plus de cela, nous avons prévu 150 € de charges locatives mensuelles, auxquelles il faut ajouter 200 € de frais internet et de communication téléphone (intervention pour les GSM des dirigeants de 30 € incluse).

Pour le bâtiment, nous souhaitons également nous prémunir d'un risque lié à l'utilisation de machines potentiellement dangereuses (notamment le tank à azote), en contractant une assurance multirisque nous protégeant contre les incendies, le vol ou encore les catastrophes naturelles, prévue comme une dépense de 300 € mensuelle (AXA 2016).

La certification GLP de nos laboratoires, qui concerne l'implémentation de procédures strictes et mise à disposition de documentation, ne représente pas un coût direct supplémentaire mais une augmentation de la charge de travail des collaborateurs de l'entreprise. Son coût est donc intégré dans les ressources humaines.

Les trois fondateurs et co-gérants seront rémunérés 1 900 € bruts, soit un coût de 68 400 € par an pour l'entreprise. De même, le salaire de 5 500 € du CEO, engagé en 2018, représentera une dépense annuelle de 66 000 € à partir de ce moment-là.

Concernant les employés, le technicien de laboratoire et son salaire mensuel brut de 3 000 €, coûteront annuellement à *Scancell* 55 958 € en 2017, cotisations patronales, treizième mois et pécules de vacances inclus, et augmentera de 3 % tous les ans. De même, l'agent commercial représente une dépense annuelle de 74 611 €, ceci incluant la voiture de société mise à sa disposition, représentant un coût d'environ 500 € par mois

(BeCompta 2012). Un bonus payable annuellement de 2 500 € pourra de plus lui être accordé dans le cas où les objectifs de vente sont atteints. Ce bonus a été intégralement considéré dans le plan financier, même s'il pourrait arriver qu'il ne soit pas versé à l'employé.

En plus de cette rémunération, 5% des frais de personnels, soit environ 400 € mensuels ont été alloués aux secrétariats sociaux (Groupe S 2015), et 150 € mensuels à la comptabilité, pour la réalisation externe de l'écriture du bilan (Comptable-Belgique 2016).

5.2.3 Investissements

Les investissements nécessaires à l'installation de notre activité sont relativement lourds. En effet, nos tests requièrent de nombreuses machines que nous avons décidé d'acheter au vu de l'usage extensif que nous en ferons en R&D. A l'avenir, pour des demandes plus ponctuelles, par exemple, le développement sur quelques mois d'une technologie, le *leasing* (la location-financement) de certains appareils par une institution bancaire est une possibilité.

Une première partie du laboratoire qui contient la majorité de nos machines représente une dépense initiale HTVA de 66 944€, dont 40 000€ pour l'appareil de qPCR (Roche 2016), 12 444€ pour un vortex (Thermoscientific 2016), ainsi qu'un shaker, une centrifugeuse et une plaque chauffante.

La pièce de culture où seront effectuées les cultures d'échantillons cellulaires est composée d'un flux laminaire coûtant 2 610 € (Kaiser Kraft 2016) et d'un incubateur de 7 500€ (Thermoscientific 2016). A cela, il nous faut encore ajouter le prix de nos réfrigérateurs (2-6°C), et congélateurs (-20°C, -80°C), pour un total de 9 402€ HTVA (Laboandco 2016). Le dernier appareil nécessaire est un tank azote, ainsi que les différents raccords nécessaires, revenant à 11 990 € (TempLab 2016).

La création de l'identité de la marque, au niveau marketing, se fera en ligne via un site tel que *99designs*, où plusieurs projets nous seront soumis, nous permettant de décider lequel nous plait le plus pour un prix de 1 499 € (logo et pack identité de marque – Gold).

En ajoutant 1 500 € de mobilier de bureaux, le dépôt de la marque en Europe pour 1 500 € et des frais des constitution de 2 000 €, comprenant la réalisation de l'acte notarial et l'inscription en tant qu'entreprise commerciale à la BCE, nous obtenons une vue d'ensemble des investissements initiaux les plus importants, pour un total de 94 835 €.

Une fois en phase 2, en 2018, notre banque de données cellulaires, couplée au stockage de nos kits, nous oblige à posséder en interne une pièce de culture aux normes GMP, de laquelle nous pourrions insérer les lignées cellulaires qui personnalisent les kits pour notre client. Il s'agit donc d'un incubateur et de flux laminaires, en plus d'une rénovation des laboratoires actuels, considérés pour un total de 18 000 €. La certification GMP impose elle aussi des frais supplémentaires, estimés à 20 000 € la première année, puis 15 000 € par an ensuite, comme dévoilé par Philippe Van Der Hofstadt de *B& C Group*.

A noter que comptablement, tous ces investissements seront actés et amortis sur cinq ans.

5.3 Financement

Le financement, pour les entreprises de biotechnologies, est un problème majeur (KPMG 2013) afin d'assurer leurs activités de recherche et développement. Pour pallier ses besoins financiers, une entreprise peut utiliser soit ses fonds propres, apportés par les fondateurs ou par l'activité de l'entreprise, ou des fonds empruntés par la société auprès d'un tiers (Janssen 2009). Le problème des entreprises biotechnologiques est que le financement par l'activité est souvent inexistant dans les premières années d'existence de l'entreprise, à cause des importantes R&D et validations légales nécessaires pour commercialiser un produit. Un certain nombre d'entreprises développent ainsi des partenariats avec d'autres acteurs du secteur, par le biais, par exemple, d'un accord de licence issu de la propriété intellectuelle qu'ils détiennent, et qui permet ainsi de dégager des ressources supplémentaires pour financer le développement, via par exemples des *royalties*. Dans notre cas, puisque nous ne disposons pas, lors de la création de l'entreprise, des pleins droits sur la propriété intellectuelle, cette approche sera difficilement mise en place. Elle permet néanmoins de nous conforter sur l'assurance de la négociation d'un accord de licence avec *Celyad*, qui bénéficierait rapidement d'un tel partenariat.

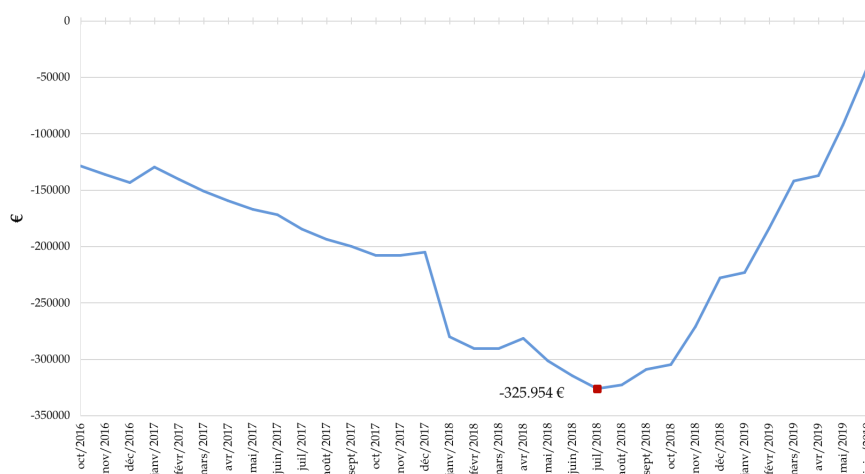


FIGURE 5.3 – Evolution de la trésorerie sans financement, pour déterminer le besoin en financement de l'entreprise.

Nous devons donc trouver des sources de financement externes afin de combler les 326 000 € nécessaires au bon déroulement opérationnel, permettant de financer un an et demi d'activité à faible revenu ou revenu nul, commercialisant en fin de compte un produit validé par les autorités de la santé. Ce montant correspond à la valeur minimale de la trésorerie que nous rencontrerons en janvier 2018 selon nos prévisions financières (Figure 5.3). A noter que débute à ce moment-là la commercialisation de nos kits, à partir de laquelle nous devenons rapidement rentables.

Au vu de l'importante somme d'argent nécessaire pour valider nos prévisions financières, nous avons décidé de diversifier les sources de financement utilisées en deux rounds successifs, effectués à des moments différents. Premièrement, nous souhaitons lever 165 000 € qui nous permettront à la fois de procéder aux investissements fixes nécessaires à la création de l'entreprise (principalement, l'installation d'un laboratoire et l'achat de nos machines spécialisées), mais aussi d'être soutenable opérationnellement pendant un an d'exercice. Ce premier financement a pour but de ne pas diluer l'actionnariat, afin de garder le plein pouvoir de direction le plus longtemps possible. Dans un second temps, nous lèverons 200 000 € supplémentaires (en deux temps) via des investisseurs externes, type *Business Angels*, ce qui s'accompagnera cette fois fort probablement d'une cession de parts. Le calcul de la valorisation de l'entreprise sera traité plus loin dans ce chapitre [> 5.5 Valorisation].

Nous allons maintenant développer les différentes sources de financement mises en place.

5.3.1 3F - *Fools, Friends & Family*

Comme nous l'avons déjà signalé précédemment, les trois fondateurs et porteurs du projet auront part égale dans l'entreprise, soit $1/3$ de l'actionnariat chacun.

En tant que premiers bailleurs de fonds, nous apporterons chacun 15 000 €, issus de nos épargnes respectives, ou encore des 3F (*Friends, family and fools*), c'est-à-dire, notre cercle proche de connaissances souhaitant nous encourager financièrement pour le projet. L'avantage principal de cette source financière, est qu'elle n'engage généralement pas les donateurs dans la gestion de l'entreprise ou son actionnariat que nous souhaitons conserver intact le plus longtemps possible. Cet apport est en effet souvent perçu comme un cadeau pour les fondateurs de l'entreprise ou éventuellement comme un prêt à long terme. Ces fonds, souvent investis sur des bases qui ne sont pas entièrement rationnelles, doivent néanmoins être libres de tous malentendu quant aux modalités pratiques qui y sont liées (rendement, remboursement, etc.), afin de ne pas créer de conflits en famille ou de problèmes entrepreneuriaux (1819.brussels 2015).

Ce financement sur fonds propre est également considéré comme indispensable pour témoigner de l'implication des fondateurs, conséquence du risque financier qu'il implique pour nous (Entrepreneur 2015). Cette implication sera utile plus tard dans l'obtention d'emprunts bancaires ou des négociations avec des *Business Angels*.

5.3.2 Emprunt bancaire

Dans la catégorie des dettes financières à long terme, se retrouvent notamment les emprunts bancaires. Largement utilisés par les particuliers, ils seront dans notre cas une manière de financer nos premiers investissements lourds concernant les machines et l'installation de laboratoires. Les taux d'intérêts sont aujourd'hui très bas ; une banque comme ING par exemple, pourra nous octroyer un prêt à tempérament de 120 000 €, remboursable sur dix ans avec intérêts payés à terme échu, c'est-à-dire à la fin de chaque période, d'environ 3%, soit une mensualité de 874 €.

Nous souhaitons également débloquer un crédit de fond de caisse qui consiste cette fois en une dette à court terme et qui permet de faire face à certains manques de liquidités temporaires, dus notamment aux retards de paiement d'un fournisseur par exemple. Ce sont des contrats négociés en avance, à taux d'intérêt nettement plus élevés que leurs équivalents à long terme, pour pouvoir très vite disposer de liquidité en cas de problèmes. Généralement, cette somme est retirable directement depuis le compte à vue. Dans notre cas, nous souhaitons nous assurer 20 000 € de crédit de caisse, avec des intérêts qui devraient avoisiner 6% aujourd'hui, payables trimestriellement chez ING.

A noter que ces emprunts bancaires sont souvent assortis d'une obligation de prise de risque des contractants, a fortiori pour une jeune entreprise comme la nôtre, en apportant par exemple, un pourcentage de la somme du montant demandé, ainsi qu'une garantie sur le patrimoine personnel.

5.3.3 *Business Angels*

Après six mois d'exercice environ, nous serons aptes à effectuer nos premières analyses de tests, afin de débloquer nos premiers revenus. C'est également à ce moment-là que nous aurons besoin de fonds supplémentaires, car nos revenus opérationnels ne seront pas suffisants pour compenser les dépenses en R&D notamment. Nous pensons en profiter pour recruter certaines compétences manquantes, c'est-à-dire de l'expérience managériale dans ce type de secteur.

Ainsi, nous souhaitons combiner les deux, en engageant un CEO externe qui apporterait en plus un capital de 100 000 € dans la société, et donc, de l'actionnariat, lui procurant une motivation financière supplémentaire au bon fonctionnement de l'entreprise. Ce montant nous permettra de tenir jusqu'à la commercialisation des kits, un an plus tard, où une nouvelle injection de 100 000 € sera nécessaire, afin de nous aménager notre propre pièce de culture GMP, pour finalement atteindre notre break-even peu après. De plus, le programme « CxO » mis en place récemment en région wallonne, permet aux start-ups de recruter des managers experts en étant financé

par la *Sowalfin*, à hauteur de 75% du salaire de ce manager la première année, 50% la deuxième et 25% la troisième. Notons que les derniers subsides pour ce programme ont été attribués en novembre 2015, ce que nous avons appris lors d'une rencontre au forum *M&M* avril 2016). Par mesure de précaution nous n'en avons donc pas tenu compte dans nos estimations financières.

Ces investisseurs externes, souvent appelés *Business Angels*, sont des personnes ayant « généralement une grande expérience des affaires » (Janssen 2009) et mettent à la disposition de jeunes start-ups expertise et argent (entre 15 000 et 500 000 €). Au cas où cet investisseur ne souhaiterait pas s'impliquer dans la gestion quotidienne de l'entreprise, nous recruterions simplement un CEO externe, sans position dans l'actionnariat de l'entreprise.

La dilution de ce dernier impliquée par cette augmentation de capital serait relativement limitée, puisque nous pourrions alors valoriser l'achèvement du développement de nos tests dans les négociations.

Finalement, nous n'avons pas prévu de stratégie de sortie particulière, notre but étant de pérenniser l'entreprise à long terme et non pas d'inclure dans l'équipe une personne cherchant un rendement rapide.

5.3.4 *Crowdfunding*

L'hypothèse d'un financement par financement participatif (le *crowdfunding*) a également été formulée, même si les projets B2B ne sont pas les plus fréquents pour ce genre de campagne, ils représentent par exemple moins de 10% des projets chez *MyMicroInvest* (MyMicroInvest 2016). Ceci étant, notre technologie, bien que probablement incomprise par une immense majorité de la population, a néanmoins un but final très loyal : la préservation de la santé humaine, à laquelle pourrait être sensible le « *crowd* ».

Plusieurs types de crowdfunding existent : (i) le don, (ii) la récompense, où les investisseurs reçoivent une compensation proportionnelle au montant injecté, (iii) l'*equity*, c'est-à-dire, l'achat d'actions de la société, (iv) la dette, consistant en un emprunt long terme, remboursable selon des conditions préalablement définies.

Des plateformes telles que *KissKissBankBank* ou *KickStarter* (actives dans le créneau du don et de la récompense) peuvent permettre de facilement atteindre les 3F dont nous parlions un peu plus haut, en utilisant les réseaux sociaux pour profiter de l'engouement. Par contre, *MyMicroInvest*, s'insère comme actionnaire, et présente l'avantage de donner accès à un large réseau de *Business Angels*, la part investie étant répartie non seulement par l'apport de la foule, mais aussi par l'apport d'un particulier (ce que nous expliquait

au téléphone Sébastien Commeyne de *MyMicroInvest*), pour des montants de minimum 100 000 €, dont 50 000 € par un particulier. Le pourcentage exigé par ces entreprises tourne entre 5 et 10% du montant récolté. Cette technique pourrait être utilisée lors de notre deuxième round de financement, lorsque nous rechercherons un *Business Angel*.

5.3.5 Aides publiques

Une dernière source de financement que nous utiliserons rassemble les différents subsides et aides publiques, qui visent à promouvoir la création d'entreprise et à encourager les investissements économiques, comme nous l'avons expliqué auparavant dans notre analyse PESTEL, dans le deuxième chapitre [> 2.4 Macro-environnement].

Parmi ces subsides, en plus du programme « CxO » dont nous parlions plus haut, nous retrouvons la populaire bourse de préactivité, gérée par l'Agence de stimulation économique, l'ASE, s'élevant à 12 500 € en Région wallonne (Wallonie 2016), destinés à couvrir 80% des dépenses facturées lors de l'étude de faisabilité du projet.

La Région wallonne intervient également financièrement dans divers projets de recherche technologique. Par exemple, la subvention « conseil en vue d'un transfert de technologie » (SPW 2016), propose jusqu'à 200 000 € pour les PME souhaitant acquérir une technologie développée dans d'autres laboratoires (à hauteur de 75% du montant), ce qui nous servira dans l'accompagnement de nos négociations avec *Celyad*.

Ajoutons également que, en cas de révision de nos prévisions financières, si nous nécessitions, un financement plus important, nous pourrions également faire appel aux fonds d'investissements de la région wallonne, tels que la Société régionale d'investissement de Wallonie (SRIW). Néanmoins, puisque nous cherchions également de l'expertise, le choix d'un *Business Angel* a été préféré.

Une dernière source externe non-négligeable concerne les fonds de l'Union européenne qui investit beaucoup dans des programmes de lancement d'entreprise, et notamment dans les domaines technologiques qui peuvent être pénalisés par les importants investissements initiaux qui sont à réaliser. Un type de bourse correspond totalement au projet, les « *Tools and technologies for advanced therapies* » (PHC-16), mais elle n'est pas disponible pour le moment (EC 2016); nous avons donc préféré ne pas en tenir compte dans nos prévisions financières.

5.4 Résultats et indicateurs de performance

5.4.1 Rentabilité

Le détail du bilan prévisionnel se trouve en annexe [> Annexes financières], de même que les résultats prévisionnels et les tableaux de flux de trésorerie. Nos prévisions nous amènent à déterminer un seuil de rentabilité en août 2018, lorsque le niveau du chiffre d'affaires permettra de combler l'ensemble des charges fixes et variables (Agence France Entrepreneur 2015), ce qui dans notre cas correspond à une masse critique de 81 kits vendus par mois.

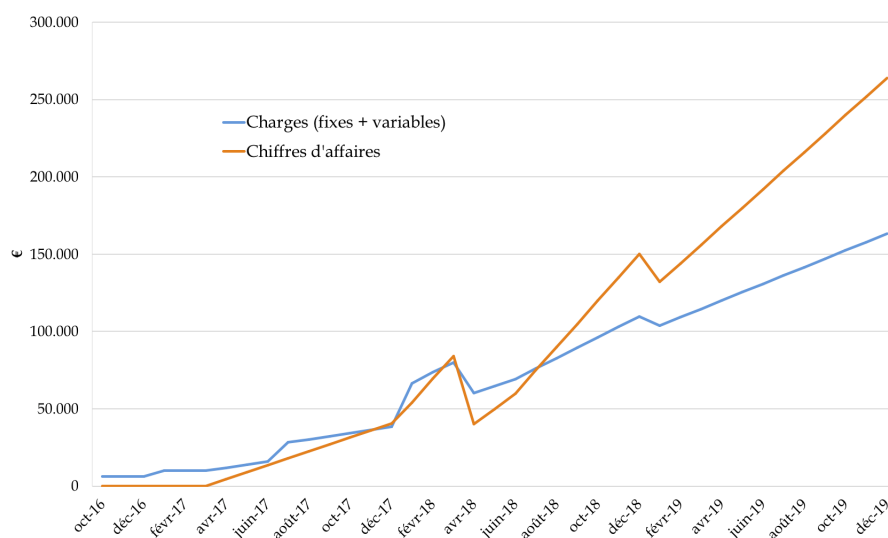


FIGURE 5.4 – Seuil de rentabilité de Scancell, suivant l'évolution des charges et chiffre d'affaires.

Nous pouvons constater que ce seuil de rentabilité a déjà été atteint précédemment, en phase 1. Ceci s'explique par le fait que les charges sont maintenant volontairement assez basses (pas de recrutement par exemple) dans cette première phase stratégique, afin de pouvoir s'acquitter des recherches et développements nécessaires à faible coût.

La figure 5.5 représente le bénéfice (ou EBITDA pour « *Earnings Before Interest, Taxes, Depreciations and Amortissements* ») mensuel de l'entreprise, qui est la différence entre les deux droites de la Figure 5.4. Il fera l'objet d'une étude de sensibilité dans une section ultérieure de ce chapitre [> 5.6 Analyse de sensibilité].

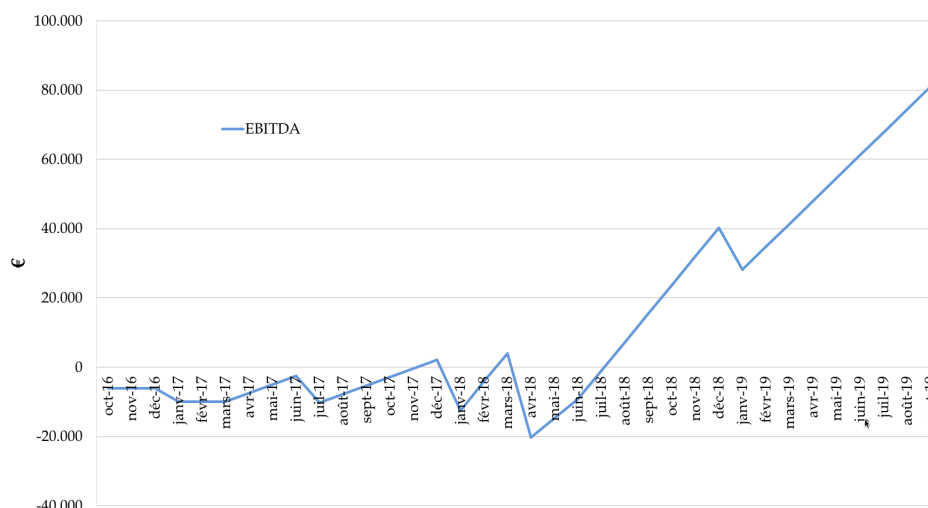


FIGURE 5.5 – Bénéfice (ou EBITDA en anglais), la différence entre le chiffre d'affaires et les charges fixes et variables de Scancell, entre Octobre 2016 et Août 2019.

Il est souvent intéressant de coupler l'analyse de ce seuil de rentabilité avec le ratio de rentabilité financière (ROE), obtenu en divisant le résultat net de l'exercice par les fonds propres de l'entreprise (De Rongé 2013).

Tableau 5.1 – Ratio de rentabilité financière (ROE), sur quatre an d'exercices.

	2017	2018	2019	2020
ROE	-40%	25%	76%	54%

D'abord négatif en 2017, en raison d'un résultat net négatif couplé à des fonds propres très faibles, il atteint 76% en 2019. Il diminue par contre à nouveau en 2020, à cause de la diminution de notre prix de vente, et donc de notre rentabilité.

5.4.2 Trésorerie

Un autre point critique dans la gestion d'une entreprise est sa trésorerie. En effet, les différences entre la date de vente et celle du paiement peuvent parfois entraîner de graves problèmes pour la pérennité de l'entreprise.

S'inscrivant uniquement dans le cadre de relations B2B, nous avons prévu un délai de paiement d'un mois, tant envers nos fournisseurs que nos clients, ce qui est la norme dans le secteur (ceci nous a été confirmé par l'entreprise *Celyad* et *B&C Group*).

Avec notre financement évoqué dans la section précédente, nous obtenons le graphe suivant de l'évolution de la trésorerie de *Scancell*, qui, comme nous le voyons Figure 5.6, subit deux pics de dépenses importants : le premier, peu visible, puisque lors du

premier mois d'exercice (nous partons de 165 000 € de capital) nous investissons plus de 100 000 € dans nos installations ; le second en début 2018, où, malgré l'arrivée de 100 000 € dans le capital, les importants frais d'exploitation (notamment le recrutement d'un CEO) ainsi que de nouveaux investissements ne permettent pas directement d'être compensés par la vente des kits qui débute seulement. Ce n'est qu'à la fin de l'été 2018, lorsque notre seuil de rentabilité est atteint que la trésorerie devient croissante.

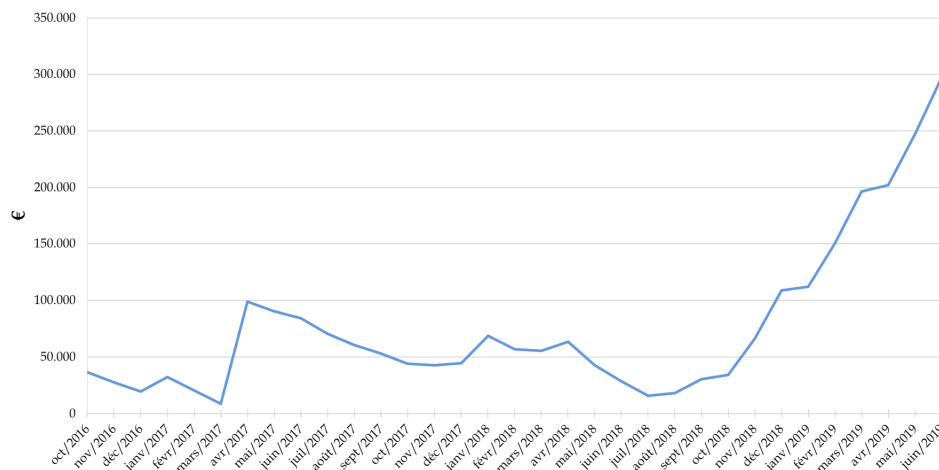


FIGURE 5.6 – Evolution de la trésorerie mois par mois avec le financement pré-cité.

5.5 Valorisation

Obtenir une valeur de l'entreprise aura un intérêt pour nous lors de discussions avec d'éventuels partenaires, mais surtout lors des négociations pour notre augmentation de capital en début de phase 1. Concrètement, il s'agit d'estimer un prix de marché à un moment donné (Fronville & Streel 2011).

Pour estimer la valorisation de notre entreprise, nous utilisons la méthode des flux futurs de trésorerie (« *discounted cash-flows* »), qui consiste à calculer la valeur actuelle de la trésorerie future générée par l'activité (Faroult 2007). Les flux de trésorerie, détaillés précédemment, sont actualisés par un taux de rendement r_{WACC} , le coût moyen pondéré du capital, qui quantifie le risque lié à l'investissement et mesure la rentabilité attendue pour les actionnaires.

$$PV = \frac{FCF_1}{(1 + r_{WACC})} + \frac{FCF_2}{(1 + r_{WACC})^2} + \frac{FCF_3 + TV}{(1 + r_{WACC})^3}$$

Où,

PV (« *Present Value* ») est la valeur actuelle de l'entreprise ;

FCF_i est le flux de trésorerie de l'année i ;

r_{WACC} , (« *Weighted Average Capital Cost* ») est le coût moyen pondéré du capital ;

TV (« *Terminal Value* ») est la valeur de l'entreprise en fin d'année 3.

Les flux de trésorerie ayant été calculés précédemment, il nous reste à déterminer le coût moyen pondéré du capital (r_{WACC}) et la valeur de l'entreprise en fin d'année 3 (TV).

- Le coût moyen pondéré du capital (r_{WACC})

$$r_{WACC} = r_e \times \frac{E}{(E + D)} + r_d \times \frac{D}{(E + D)} \times (1 - t)$$

Où,

D représente nos dettes, elles sont de 120 000 € (emprunt sur dix ans) ;

r_d , le taux d'intérêt sur notre emprunt, soit 3% ;

E , nos capitaux propres (« *Equity* ») ;

r_e , le coût des capitaux propres, encore inconnu ;

t , l'impôt des sociétés en Belgique, soit 34%.

Nous calculons r_e , le coût des capitaux propres, c'est-à-dire le rendement attendu d'un investisseur sur sces capitaux propres, par le *Capital Asset Pricing Model*(CAPM) (Janssen 2009 ; Hull 2015) qui prend en compte le risque financier du marché.

$$r_e = r_f + \beta(r_m - r_f)$$

Où,

r_f représente le taux d'intérêt d'un actif sans risque (déterminé par le taux des bons d'Etat belge à 10 ans), 0,6% en mars 2016 (Debtagency 2016) ;

$(r_m - r_f)$, la prime de risque du marché, fluctuant autour 6% en avril 2016 (Fenebris 2016) ;

β , le risque systématique, c'est-à-dire le risque du marché, non-diversifiable. Pour une start-up comme la nôtre, le manque de données comptables antérieures, permettant la mesure d'un rendement précis, est évidemment problématique. Cette modélisation présente des limites méthodologiques, notamment dues au fait que le bêta se calcule normalement pour une société cotée en Bourse dont le cours est liquide, ce qui est évidemment incompatible avec une situation de jeune start-up en développement. Néanmoins, en nous basant sur les normes du secteur dans lequel nous nous insérons, ainsi qu'en évaluant les risques sous-jacents à l'activité, nous pouvons considérer un bêta de 7,89 (NYU Stern 2016).

Donc,

$$\begin{aligned} r_e &= 0,006 + 7,89 \times 0,06 \\ &= 48\% \end{aligned}$$

Cette valeur assez élevée, témoigne bien du risque important lié à l'activité et au secteur. Cette valeur serait le rendement annuel attendu sur les capitaux propres par un investisseur. Nous pouvons désormais calculer le r_{WACC} :

$$\begin{aligned} r_{WACC} &= 0,48 \times \frac{45\,000}{45\,000 + 120\,000} + 0,03 \times \frac{120\,000}{45\,000 + 120\,000} \times (1 - 0,34) \\ &= 0,145 \end{aligned}$$

- La valeur de l'entreprise en fin d'année 3 (TV)

Cette valeur est fréquemment déterminée par la méthode de Gordon Shapiro (SFEV 2013), qui utilise un taux de croissance infini, basé sur les résultats antérieurs, pour approcher cette valorisation théorique sur le très long terme, telle que :

$$TV = \frac{FCF_t \times (1 + g)}{r_{WACC} - g}$$

Une telle méthode dans notre cas serait peu pertinente, car l'horizon de nos prévisions financières (trois ans) est très court, et le stade de développement de l'entreprise (la création) ne permet pas une estimation durable de la croissance, puisque celle-ci fluctue de plusieurs centaines de pour cent pour le lancement de notre projet.

Cependant, selon le rapport annuel de la Commission Européenne (2014), la croissance des PME en moyenne s'élève à 5,3% (de valeur ajoutée) sur ces dix dernières années. En utilisant cette valeur et en supposant qu'à long terme, nos prévisions suivront cette tendance, nous obtenons :

$$TV = \frac{566\,924 \times (1 + 0,053)}{0,145 - 0,053}$$

$$= 6\,479\,154$$

Maintenant que toutes les inconnues ont été résolues, nous pouvons calculer la valorisation de l'entreprise par actualisation des flux futurs de trésorerie.

$$PV = \frac{FCF_1}{(1 + r_{WACC})} + \frac{FCF_2}{(1 + r_{WACC})^2} + \frac{FCF_3 + TV}{(1 + r_{WACC})^3}$$

$$PV = \frac{-155\,016}{(1 + 0,145)} + \frac{-19\,504}{(1 + 0,145)^2} + \frac{7\,046\,078}{(1 + 0,145)^3}$$

$$PV = 2\,221\,856$$

Cette valeur est évidemment très variable selon les hypothèses formulées (notamment sur le taux de croissance, ou le bêta) qui ont des répercussions très importantes sur le résultat final obtenu, ce que nous pouvons observer en faisant varier ces deux paramètres.

Tableau 5.2 – Analyse de sensibilité de la valorisation du projet *Scancell* à l'issue de l'an 3 en fonction de la valeur du bêta et du taux de croissance.

		β				
		6	7	8	9	10
g	3%	2 600 019	2 075 227	1 700 958	1 421 603	1 205 885
	4%	2 982 100	2 329 821	1 881 169	1 554 884	1 307 800
	5%	3 483 177	2 647 605	2 098 558	1 711 690	1 425 433
	6%	4 169 091	3 055 434	2 365 953	1 898 853	1 562 725
	7%	5 165 245	3 597 902	2 702 850	2 126 133	1 725 054

La valorisation de l'entreprise peut en effet aller du simple au quadruple, en changeant simplement nos hypothèses de départ. Cette difficulté de valorisation précise aura probablement des répercussions lors de négociations avec un *Business Angel* souhaitant entrer dans l'entreprise, puisque la part de son apport dépendra fort de cette estimation.

5.6 Analyse de sensibilité

Nous souhaitons maintenant montrer comment évoluerait le bénéfice mensuel (EBITDA) de l'entreprise, en faisant évoluer certains paramètres.

5.6.1 Prix des kits

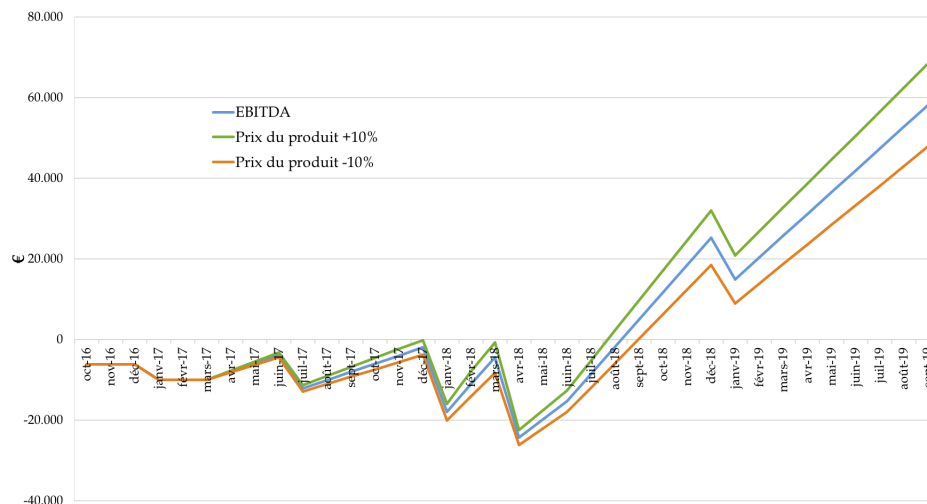


FIGURE 5.7 – Evolution du bénéfice mensuel de Scancell en fonction d'une modification du prix du produit.

Ici, nous faisons varier les prix des services et du kit, de plus ou moins 10%, toutes autres choses étant égales par ailleurs, cela décale légèrement notre seuil de rentabilité de quelques semaines.

Curieusement d'ailleurs, cette différence n'est pas énorme. Cela suppose cependant une inélasticité au prix parfaite, puisque les quantités n'évoluent pas selon le prix. Bien que le manque de concurrence et d'alternative viable rende, actuellement, l'élasticité au prix assez faible, comme nous l'avons développé dans le chapitre précédent [4.7 Gestion des relations commerciales], nous avons cependant un intérêt à maintenir un prix bas, pour rester attractifs et convaincre les entreprises de changer de technique de détection des cellules tumorales *in vitro*. Les prix des services et du kit pourraient ainsi être amenés à varier selon les desideratas du client, puisque nous pouvons nous permettre une certaine marge.

5.6.2 Royalties Celyad

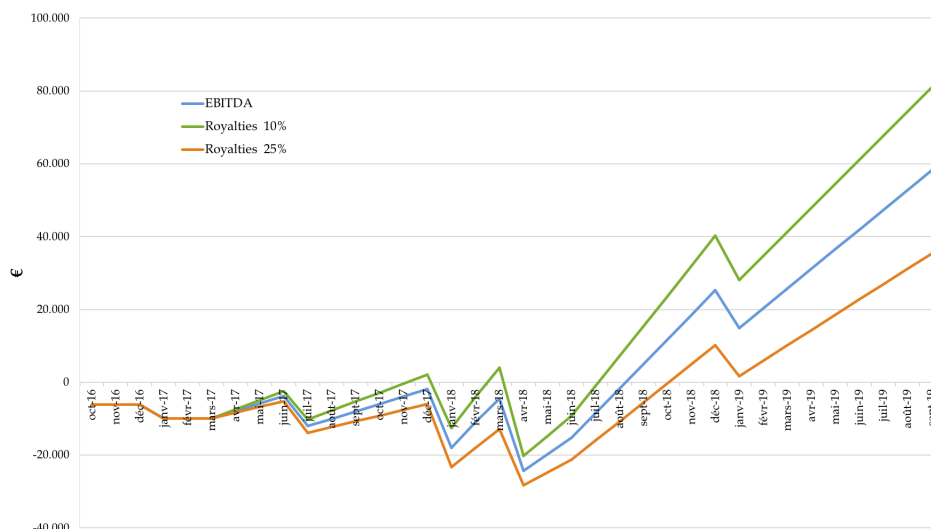


FIGURE 5.8 – Evolution du bénéfice mensuel de Scancell en fonction d’une modification des royalties versés à Celyad.

Cette fois encore, la différence en bénéfice est minime, malgré l’important modification du pourcentage de royalties accordé à Celyad, de 10%, 15% ou 20% selon l’hypothèse. Ceci souligne à nouveau l’importante marge que nous réalisons sur nos produits, ce que nous justifions par les investissements extensifs en ressources temporelles et financières qui ont dû être mises en place au préalable pour arriver avec un tel produit sur le marché.

Cette problématique de la politique de prix des entreprises de biotechnologies, souvent très éloignée des coûts de production directs, était d’ailleurs récemment sous le feu des projecteurs suite à l’intervention d’Hillary Clinton sur les réseaux sociaux (Hilary Clinton « Price Gouging » 2015).

Il faut noter que l’évolution du prix des matières premières de plus ou moins dix pour cent provoque une différence encore plus minime, pour les mêmes raisons.

5.6.3 Date de mise sur le marché des kits

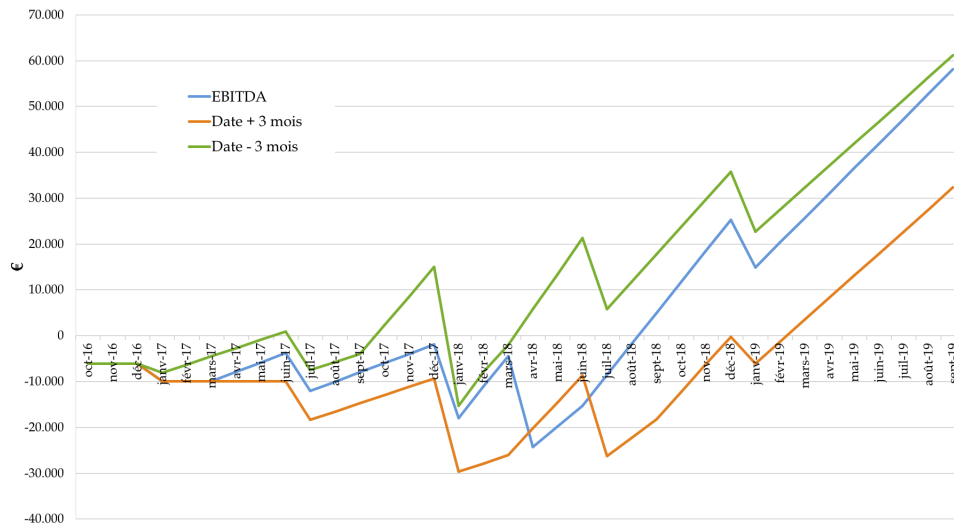


FIGURE 5.9 – Evolution du bénéfice mensuel de Scancell en fonction d’une modification de trois mois de la date de commercialisation des kits.

Cette fois-ci par contre, en avançant ou retardant la commercialisation de nos kits de plus ou moins trois mois, nous constatons que cela a des fortes conséquences sur le bénéfice direct. Cela dit, l’hypothèse pessimiste suppose que nous gardons les mêmes prévisions d’analyse de service, c’est-à-dire les arrêter en mars 2018, trois mois après la première vente théorique des kits. Au cas où cette date serait reportée, nous maintiendrions évidemment la réalisation de service même si c’est logistiquement parlant moins intéressant tant pour nos clients que pour nous.

5.7 Analyse de risque

Tout au long de ce travail prévisionnel, nous avons formulé les hypothèses les plus fidèles possibles à la réalité en fonction de nos différentes interviews et de nos recherches sur le marché que nous visons. Nous allons maintenant brièvement décrire quelles conséquences auraient le fait que certaines hypothèses soient infondées dans la réalité concrète de l'entreprise.

- **Hypothèse 1 :** *dans les trois ans, six nouveaux produits de thérapie cellulaire seront produits et commercialisés en Belgique.*

Les différentes réglementations européennes pourraient très bien empêcher certains produits d'arriver sur le marché ou retarder leur commercialisation s'ils ne répondent pas complètement aux différents prérequis des études cliniques.

Cette situation affecterait probablement le chiffre d'affaires de *Scancell*, néanmoins la part de marché relativement faible que nous visons, comparée aux alternatives actuelles, nous laisse une marge de manœuvre importante, même en considérant le marché comme peu développé. En effet, notre seuil de rentabilité se trouve à 81 kits vendus par mois en 2018, ce qui correspond à une part relativement faible du marché, même si l'un ou l'autre produit annoncé n'est pas encore commercialisé, surtout compte tenu de l'intérêt témoigné pour Telocell par ces entreprises lors de notre étude de marché.

- **Hypothèse 2 :** *nous signerons un partenariat avec une entreprise existante pour l'utilisation de ses laboratoires dans le cadre du développement de notre service d'analyse en phase 1.*

Au cas où nous ne pourrions remplir cette hypothèse, cela aurait des répercussions gênantes pour nos investissements initiaux. En effet, nous devrions alors faire construire nos propres laboratoires aux normes GMP, ce qui représente des frais très importants et donc implique un financement externe plus rapide que prévu.

L'avantage est que cette hypothèse sera confirmée ou infirmée avant même la poursuite de la recherche et développement, et est, pour ainsi dire, essentielle à l'avenir long terme de l'entreprise. Nous n'investirons donc pas des milliers d'euros en sachant que cette hypothèse est encore incertaine.

- **Hypothèse 3 :** *l'accréditation de notre package comme test de release nous permettra de cerner une partie importante des entreprises de thérapie cellulaire.*

L'accréditation accordée par l'AFMPS est, comme nous l'avons signalé au chapitre précédent, fort sujette à l'avis subjectif du comité décisionnel. La reconnaissance de notre package comme test de *release* pourrait donc prendre plus de temps que prévu, mais au vu des recherches scientifiques réalisées, confirmées par les résultats empiriques encourageants constatés lors du développement en laboratoire, nous supposons avec confiance que cette accréditation nous sera finalement accordée. Notre interview téléphonique avec les responsables de l'Agence, a notamment été instructive pour cerner au mieux les différentes procédures à respecter afin de parvenir à nos fins. Ces procédures ont d'ailleurs déjà été entreprises au stade actuel de développement par Celyad.

Au cas où nous ne recevrons pas cette accréditation légale, nous pensons que nos tests restent suffisamment attractifs, tant financièrement que qualitativement, pour en faire un produit attirant pour nos entreprises-cibles. Nous pourrions également compenser ce manque de clients belges par une expansion plus rapide au niveau géographique ainsi qu'une diversification de la clientèle, comme par exemple en développant le marché des « *drug discovery* », comme stipulé dans le troisième chapitre [> 3.6 Evolution commerciale].

- **Hypothèse 4 :** *une augmentation de capital sera faite en fin de phase 1 pour bénéficier de l'expertise et de fonds de 100 000 € d'un investisseur externe.*

En fin de phase 1, nous aurons l'avantage d'avoir déjà eu des contacts fréquents et réguliers avec les entreprises de thérapie cellulaire, par la réalisation d'un service d'analyse de leurs échantillons cellulaires. Autrement dit, nous aurons déjà largement confronté notre produit aux besoins des clients, et pourrions préciser de manière plus sûre les évolutions futures de l'entreprise.

De plus, le montant relativement faible en comparaison avec l'important retour sur investissement dans un délai assez bref, nous font croire que des investisseurs externes seront tentés par le projet, malgré une certaine part de risque.

Au cas où nous ne trouverions personne possédant l'expertise et les fonds nécessaires, nous pourrions toujours nous tourner vers le *crowdfunding*, ou d'autres formes de prêt à long terme.

Conclusion

Une série d'expériences scientifiques et des intuitions productives, la confrontation à des outils légaux et l'adéquation à la loi, l'insertion de ces produits dans les exigences du marché et la réalité économique nous ont conduits jusqu'ici ...

Il est temps maintenant de conclure. L'exercice est difficile, car il impose de synthétiser l'acquis et d'ouvrir les perspectives.

- *Opportunité et marché*

Tout d'abord, il nous semble essentiel de rappeler quelques éléments clés de notre parcours, débuté dans les laboratoires de l'entreprise *Celyad par les recherches scientifiques de Charlotte Bertrand* grâce auxquelles nous avons pu découvrir une opportunité dans un marché innovant.

Le secteur de la thérapie cellulaire possède en effet un besoin d'une alternative fiable et économiquement avantageuse pour l'évaluation de la tumorigénicité in vitro dans ses lots de « cellules-médicaments ». Ces dernières représentent aujourd'hui des espoirs de guérison pour de nombreuses maladies par lesquelles nous sommes tous touchés directement ou indirectement. Le marché de la thérapie cellulaire est particulièrement intéressant dans le cadre du lancement d'une *start-up*, pour trois raisons principales. Tout d'abord, il s'agit d'un secteur relativement récent, ce qui limite son intensité concurrentielle pour *Scancell*, tout en nous ouvrant également des portes en termes de partenariats. Ensuite, comme nous venons de l'évoquer, le potentiel de la thérapie cellulaire est grand, puisque les entreprises belges pourraient à elles seules traiter plusieurs millions de patients. Finalement, ce marché est un important vecteur de valeurs humaines.

Dans ce secteur, la Belgique représente un marché particulièrement avancé et conséquent en termes de développements de produits ; seize produits, issus d'entreprises belges, sont actuellement à l'étude et l'un d'entre eux, ChondroCelect de *Tigenix*, est commercialisé.

Sur ce terrain privilégié de mise en orbite, nous venons apporter une solution de détection in vitro des cellules tumorales : Telocell. Les tests que nous proposons possèdent de multiples avantages, tant sur le plan scientifique que commercial. En effet, parce qu'ils se basent sur une caractéristique que toutes les cellules tumorales possèdent, mais également parce qu'ils sont plus sensibles et personnalisables, les tests de Telocell sont plus fiables que la méthode actuellement privilégiée par les acteurs de la thérapie cellulaire – le caryotype -. De plus, si on les compare au procédé du caryotype, ils sont environ deux fois moins chers et d'une rapidité de mise en œuvre de trois fois supérieure pour le service et même de trente fois supérieure pour le kit ce qui témoigne de leur haut potentiel commercial.

- *Diagnostic stratégique et opérationnel*

Afin d'apporter notre solution sur ce marché, nous devrons tout d'abord négocier avec *Celyad* le transfert de la propriété intellectuelle des tests qui ont été développés par Charlotte Bertrand dans leurs laboratoires. Comme nous l'avons présenté dans ce document, cette négociation est la volonté des deux parties, et ne devrait donc pas bloquer notre activité. Elle sera de plus facilitée par le fait que le produit Telocell n'a pas encore été breveté par *Celyad*.

Une fois la propriété intellectuelle acquise, nous nous implanterons en suivant une stratégie constituée de trois phases successives.

La phase 0 consistera à finaliser la validation scientifique de nos tests pour permettre, en phase 1, leur commercialisation en service (900 €). Pour assurer cette production, nous souhaitons à ce moment de notre stratégie utiliser le laboratoire d'une CRO partenaire, aux normes GMP. Les autres étapes du service proposé aux acteurs de la thérapie cellulaire seront sous-traitées à des entreprises dont c'est l'expertise. Ce faisant, nous pourrions récolter un grand nombre de données dans le but de consolider et d'envoyer notre dossier à l'AFMPS en vue de l'obtention d'une accréditation en tant que tests de *release*.

Au cours de la première phase de commercialisation, plusieurs changements opérationnels verront le jour, puisque l'équipe s'agrandira à la suite du recrutement d'un technicien de laboratoire et d'un commercial, mais également de l'arrivée d'un CEO externe expérimenté. De plus, lors de cette phase, le marketing sera crucial car il nous permettra de créer notre base de clients qui s'étendra naturellement une fois les tests vendus en kits. Notons finalement qu'à ce moment, nous serons en SPRL. Cependant, en fin de phase 1, l'augmentation de capital prévue pourrait nous pousser à passer en SA.

Après un an de service, nous lancerons notre production à grande échelle, cette fois sous la forme d'un kit (1 000 €) de tests qui pourront être réalisés en interne par nos clients. Etant donné que nous sous-traiterons la majeure partie de la production des kits, nous pourrions nous focaliser sur le pôle R&D de l'entreprise, afin de préparer l'avenir. . .

Dès la création de l'entreprise, nous devons accorder une attention particulière à diverses protections juridiques, la plus importante d'entre elles est le maintien du secret concernant notre savoir-faire. Pour cela, la gestion des relations commerciales, tant avec nos clients que nos fournisseurs et autres partenaires, jouera un rôle prépondérant. De plus, des mesures internes à notre entreprise devront être mises en place.

- *Milestones, facteurs de succès et risques*

Pour résumer le cheminement de *Scancell*, il nous semble maintenant opportun de présenter quelques jalons, ainsi que les facteurs clés du succès et les risques qui y sont associés.

Tout d'abord, mentionnons que malgré que le marché de la thérapie cellulaire représente un terrain privilégié de mise en orbite pour une entreprise telle que la nôtre, nous sommes conscients du risque associé à la taille de celui-ci (marché de niche). Pour cette raison, après plusieurs années d'activité, nous étendrons la zone géographique visée et diversifierons notre gamme de clients.

Le premier seuil que nous devons atteindre est bien évidemment l'obtention d'un financement. Les projets biotechnologiques requièrent généralement un investissement initial conséquent, et *Scancell* n'échappe pas à la règle (165 000 €). Cette somme peut s'expliquer par des coûts liés au lancement de l'entreprise qui ne seront pas complètement compensés par le chiffre d'affaires dans les premières années, ainsi que par la nécessité d'investir en R&D pour rester compétitifs. Tout de même, afin de diminuer le financement initialement requis pour le projet, nous nous sommes efforcés de diminuer les coûts fixes liés à notre activité en ayant recours à la sous-traitance et à d'autres partenariats.

Une fois le financement obtenu, il sera important de finaliser le développement et la validation des tests de Telocell en laboratoire. Ceci est indispensable pour proposer une offre complète aux acteurs de la thérapie cellulaire. Une période suffisante a été attribuée à la mise en œuvre de ces recherches.

Une fois les tests validés, les premières analyses de service de Telocell pourront être lancées. Dans ce cadre, deux étapes sont particulièrement importantes : au début de cette phase, la signature d'un partenariat avec une CRO existante pour le partage de laboratoires de production, et juste avant de passer à la phase suivante, l'obtention de

l'accréditation en tant que tests de *release*.

Notons que ces deux facteurs sont risqués pour notre projet, mais que ce risque sera minimisé. En effet, une renonciation à notre partage de laboratoire de production impacterait notre besoin en financement initial. Cependant, dans cette éventualité, nous pourrions rapidement nous retourner puisque l'obtention de ce laboratoire est, pour ainsi dire, indispensable au commencement de notre activité de commercialisation.

En ce qui concerne l'accréditation, celle-ci n'est pas indispensable à notre succès, mais y contribue fortement étant donné l'attestation de fiabilité de nos tests qui en découlerait. Même si nous avons supposé l'obtenir, étant donné la bonne direction des négociations déjà menées entre *Celyad* et l'AFMPS dans ce cadre, nous ne pouvons pas exclure que les démarches liées à l'accréditation soient plus longues que prévu ou même abrégées suite à un refus des autorités de la santé. Dans le premier cas, cela nous pousserait à retarder la commercialisation de Telocell sous la forme d'un kit, pour autant que nous soyons certains d'être accrédités en bout de processus. Dans le second cas, où nos tests ne seraient pas accrédités, les acteurs de la thérapie y verraient toujours un usage dans un cadre pur de R&D, c'est-à-dire dans le but d'optimiser leurs procédés de production de « cellules-médicaments ». Étant donné que ceci diminuerait le volume des tests de Telocell, il serait alors nécessaire pour nous de trouver une solution afin de compenser cette perte partielle en termes de volumes. Ainsi, nous pourrions accélérer notre expansion territoriale mais aussi notre ouverture à d'autres secteurs de la santé.

En fin de première et de deuxième phase stratégique, nous prévoyons également une levée de fonds, ayant pour but de soutenir les activités de R&D, qui deviendront centrales lorsque nous commercialiserons notre produit sous la forme d'un kit. Ceci représente un important défi, facteur du succès de notre entreprise, puisque, la R&D sera pour nous un pivot essentiel pour créer de la valeur sur le long terme.

- *Perspectives*

Bien que limités par le cadre de cette recherche, nous aurions cependant pu aller plus loin, notamment dans les contacts concrets avec les entreprises de thérapie cellulaire, desquelles il a parfois été difficile d'obtenir des informations, tant la protection du savoir-faire requiert dans ce domaine une importance particulière, ou encore dans la validation de nos hypothèses économiques concernant la location de laboratoires par exemple.

Confiants dans les portes qu'ouvre cette recherche, nous voulons ici réaffirmer que, à la condition de la réussite des négociations avec l'entreprise *Celyad* pour l'exploitation des tests développés dans leurs laboratoires, combinée avec la crédibilité qu'offre l'accréditation accordée par l'AFMPS, ainsi qu'à un développement technologique suffisant à moyen terme, le projet *Scancell* est viable économiquement.

A l'heure où nos chemins s'éloignent des bancs de l'université, l'entrepreneuriat est certainement devenu pour nous un choix de vie plus accessible qu'auparavant, même si *Scancell* n'aboutira peut-être pas directement dans la forme et avec l'équipe présentée. Nous continuons à croire en ce projet que nous avons porté ici.

"Caminante, no hay camino se hace camino al andar"

- *Marcheur, il n'y a pas de chemin, celui-ci se fait en marchant*

— ANTONIO MACHADO (1875 - 1939)

Face à l'omniprésence des multinationales, des investissements mondialisés, l'avenir peut être infiltré par des initiatives nouvelles, scientifiquement valides, juridiquement cohérentes, économiquement viables, et surtout, humainement porteuses...

DEUXIÈME PARTIE

Annexes

A	Annexes scientifiques	215
B	Etude de marché	365
B.1	Résultats de l'étude de marché	366
B.2	Interviews	369
B.2.1	<i>Biowin</i>	369
B.2.2	<i>Bone Therapeutics</i>	371
B.2.3	<i>MasTherCell</i>	378
B.2.4	<i>Novadip.</i>	380
B.2.5	<i>Promethera</i>	385
B.2.6	<i>UCB</i>	387
B.3	Liste des entreprises belges de thérapie cellulaire.	390
B.4	Liste des établissements belges autorisés pour l'utilisation de MCH.	391
B.5	Liste des laboratoires de recherche de thérapie cellulaire	394
B.6	Liste des concurrents et entrants potentiels.	395
C	Curriculum vitae	397
C.1	Charlotte Bertrand	398
C.2	Antoiné Logé	399
C.3	Robin Pétré	400
D	Annexes juridiques	401
E	Annexes financières	413
E.1	Détail du coût des tests	414
E.1.1	Test 1 : mesure de l'expression de la télomérase	414
E.1.2	Test 2 : mesure de la longueur des télomères	415
E.1.3	Test 3 : signature mutationnelle ALT	416
E.2	Bilan prévisionnel à trois ans.	417
E.3	Résultats prévisionnels à trois ans.	418
E.4	Flux de trésorerie	419
E.5	Devis.	420

Annexes scientifiques

**Etude analytique pour l'évaluation de la tumorigénicité
des lots de C-Cure®**

Table des matières

Abréviations	226
I Introduction.	229
I.A Thérapie cellulaire et <i>Celyad</i>	229
I.A.1 Thérapie cellulaire	229
I.A.2 C-Cure®.	229
I.A.3 <i>Release testing</i>	234
I.B Marqueurs du cancer	236
I.C Sénescence et immortalité répliative	238
I.C.1 Sénescence répliative	238
I.C.2 Structure des télomères	239
I.C.3 Mécanisme de raccourcissement des télomères	241
I.C.4 Activation du mécanisme de sénescence répliative	242
I.C.5 Immortalité répliative.	244
II Objectifs.	250
III Matériel et méthodes de culture cellulaire	251
III.A Décongelation*	251
III.B Comptage*	251
III.C Cycle de culture cellulaire	252
III.C.1 Ensemencement*	252
III.C.2 Confluence*	253
III.C.3 Changement de milieu*	253
III.C.4 Trypsinisation*	253
III.C.5 Congélation*	254
IV Validation de méthodes analytiques.	255
IV.A Mesure de l'expression du gène <i>hTERT</i>	255
IV.A.1 Principe	255
IV.A.2 Matériel et méthodes	257
IV.A.3 Développement préalable de la méthode analytique	260
IV.A.4 Validation de la méthode analytique	261
IV.A.5 Discussion	269
V Développement de méthodes analytiques	270
V.A Mesure de l'activité de la télomérase reverse transcriptase (<i>hTERT</i>)	270
V.A.1 Principe	270
V.A.2 Matériel et méthodes	271
V.A.3 Développement et optimisation de la méthode	274
V.A.4 Discussion	279

V.B	Détection de mutations corrélées au phénotype ALT	282
V.B.1	Principe	282
V.B.2	Matériel et méthodes	286
V.B.3	Développement et optimisation de la méthode	291
V.B.4	Discussion	299
V.C	Mesure de la longueur des télomères.	302
V.C.1	Principe	302
V.C.2	Matériel et méthodes	308
V.C.3	Développement et optimisation de la méthode	312
V.C.4	Discussion	325
VI	Conclusion	330
VII	Annexes	333
Annexe 1 - Développement du test « Soft agar »		333
I.	Introduction : la croissance indépendante de l'ancrage	333
II.	Principe.	335
III.	Matériel et méthodes	337
III.A.	Echantillons contrôles et <i>spiking</i>	337
III.B.	Méthodes	338
IV.	Développement et optimisation de la méthode.	340
IV.A.	Spécificité	340
IV.B.	Précision	341
IV.C.	Sensibilité	343
V.	Discussion	346
VI.	Conclusion	348
Annexe 2 - Composition détaillée des milieux		349
Annexe 3 - Précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase »		353
Annexe 4 - Protocole <i>multiplex</i> du test « Mesure de la longueur des télomères »		358
Annexe 5 - Résultats complémentaires du test « Mesure de la longueur des		
télomères »		360

Table des figures

1	Prévalence des différents types de maladies cardiovasculaires, en fonction du sexe (Wong 2014). Panel a, homme. Panel b, femme.	231
2	Marqueurs du cancer, tels que proposés par Hanahan et Weinberg en 2011 (figure retravaillée à partir de (Hanahan & Weinberg 2011)).	237
3	Structure télomérique (Calado & Young 2008).	240
4	Problème de réplication aux extrémités chromosomiques (Cong et al. 2002).	241
5	Mécanisme de réplication eucaryote de l'ADN (University of Leicester 2010).	242
6	Voie d'activation de la sénescence cellulaire. a, voie de réponse de dommages à l'ADN (DDR) (Sulli et al. 2012). b, mécanismes en aval de la DDR et mécanismes alternatifs d'activation de TP53 et RB (Chuaire-Noack et al. 2010).	243
7	Mécanisme de recrutement de la télomérase aux extrémités télomériques (Sandin & Rhodes 2014).	245
8	Mécanisme d'action de la télomérase (Memorial University of Newfoundland n.d.).	246
9	Modèle de recombinaison homologue impliqué dans le mécanisme ALT d'allongement des télomères (Verdun & Karlseder 2007).	248
10	Principe de qPCR utilisé pour le test de mesure de l'expression de la télomérase (figure créée sur base de (Parida et al. 2008) et (Langevin et al. 2013)).	256
11	Résultats de l'analyse de linéarité de la mesure de l'expression de <i>hTERT</i>.268	
12	Fonctionnement du test « Mesure de l'activité de la télomérase », tel que décrit dans le kit « TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA » de Roche (Roche Life Science n.d.).	270
13	Spécificité du test « Mesure de l'activité de la télomérase ».	275
14	Distribution des mutations de <i>TP53</i> dans les cancers ALT-positifs, telle qu'obtenue sur la base de données IARC <i>TP53</i>.	283
15	Méthode ASB-PCR pour la détection des mutations ponctuelles (substitution), telle que décrite par Morlan <i>et al.</i> (Morlan et al. 2009).	286
16	Comparaison des méthodes existantes de mesure de la longueur des télomères <i>in vitro</i> (modifié à partir de (Vera & Blasco 2012)).	304

17	Principe de l'amplification des répétitions télomérique dans le test « Mesure de la longueur des télomères », tel que décrit par Cawthon (Cawthon 2009). a, fonctionnement successifs des amorces télomériques (<i>telg</i> et <i>telc</i>). b, stratégie mise en place pour empêcher la dimérisation de <i>telg</i> et <i>telc</i>	305
18	Principe de qPCR utilisant un agent intercalant (par exemple, le SYBR Green) (Parida et al. 2008).	306
19	Melting curves illustrant la technique d'amplification en <i>multiplex</i> par SYBR Green, telle que décrite par Cawthon (Cawthon 2009). Les courbes sont celles obtenues pour l'amplification <i>singleplex</i> des télomères (vert), l'amplification <i>singleplex</i> de l'albumine (bleu) et pour l'amplification <i>multiplex</i> des télomères et de l'albumine (orange).	307
20	Investigation menée suite au problème de présence d'un signal dans le contrôle négatif pour l'amplification télomérique. a, <i>melting curves</i> de l'ADN extrait (en jaune), de l'ADN génomique pur (en bleu) et de l'eau <i>PCR grade</i> (en rouge). b, gel 3% agarose/TAE réalisé sur les produits d'amplification télomérique. PM : échelle de poids moléculaire.	313
21	Graphique présentant la concentration d'ADN récolté après extraction en fonction du nombre de cellules utilisées dans l'extraction.	319
22	Melting curve de la réaction de qPCR <i>multiplex</i>. Les courbes montrant un pic aux alentours de 88°C sont celles du triplicat de l'eau <i>PCR grade</i> . Les autres sont celles de l'ADN extrait et de l'ADN génomique pur. Les T_m des télomères (ligne bleue) et du gène de l'albumine (ligne rouge) ont été placées sur le graphique.	321
23	Graphiques montrant l'évolution du ratio T/S en fonction du cPD. A, évolution du ratio T/S de deux lignées tumorales contrôle (HT1080 et A549). B, évolution du ratio T/S de deux lots de cellules C-Cure®.	323
24	Mécanismes de résistance à l'anoikisie, à l'origine de la croissance indépendante de l'ancrage (Guadamillas et al. 2011).	335
25	Principe du test « Soft agar » tel qu'utilisé dans ce mémoire (figure retravaillée sur base de (Bioscience 2015)).	337
26	Spécificité du test « Soft agar », montrant le pourcentage d'AlamarBlue® réduit (non normalisé par la ligne de base) obtenu à J0 et après 8 jours d'incubation du système bicouche (J+8).	341
27	Répétabilité du test « Soft agar ». Boxplot montrant la distribution des valeurs obtenues pour six triplicats au sein d'une même expérience, à J0 et à J+8. Les valeurs d'AlamarBlue® réduit sont ici normalisées par la ligne de base. a, boxplot pour les HT1080. b, boxplot pour les BMMSCs.	342

28	Précision intermédiaire du test « Soft agar ». Boxplot montrant la distribution des valeurs obtenues pour six triplicats au sein d'une même expérience, à J0 et à J+8. Les valeurs d'AlamarBlue® réduit sont ici normalisées par la ligne de base. a, boxplot pour les HT1080. b, boxplot pour les BMMSCs.	343
29	Sensibilité du test « Soft agar » en termes de HT1080. La ligne rouge représente la LOD en termes de Δ (14,41%).	344
30	Sensibilité du test « Soft agar » en termes de cellules issues du procédé C-Cure®. Pour chaque quantité cellulaire, plusieurs échantillons différents ont été analysés. La ligne rouge la LOD en termes de Δ (14,41%).	346
31	Protocole de l'évaluation de la précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase ».	353
32	Courbes de dissociation obtenues suite à l'utilisation de différentes combinaisons de concentration en amorces télomériques. a, [telg] = 100 nM et [telc] = 100 nM. b, [telg] = 100 nM et [telc] = 300 nM. c, [telg] = 100 nM et [telc] = 500 nM.	360
33	Courbes de dissociation obtenues en combinant les amorces télomériques (dans différentes concentrations) avec chaque amorce du gène de l'albumine. a, telg (100 nM)/telc (500 nM) et albd (1 μ M). b, telg (100nM)/telc (500 nM) et albu (1 μ M).	361
34	Courbes de dissociation obtenues en combinant les amorces télomériques (dans différentes concentrations) avec chaque amorce de du gène l'hémoglobine gamma. a, telg (100 nM)/telc (500 nM) et hbgsd (1 μ M). b, telg (100 nM)/telc (500 nM) et hbgu (1 μ M).	362
35	Analyse individuelle du Cp de l'amplification télomérique et de l'amplification du gène de l'albumine a, évolution du Cp pour l'amplification télomérique pour le lot C-Cure® 1. b, évolution du Cp pour l'amplification du gène de l'albumine pour le lot C-Cure® 1. Le point gris représente une valeur hors-tendance, qui n'a pas été incluse dans la droite de régression.	364

Liste des tableaux

1	Correspondance des scores et pourcentages de confluence.	253
2	Volumes de trypsine et de SMe (neutralisation et rinçage) nécessaires au passage.	254
3	Composition du mélange de réaction de RT-qPCR pour le test « Mesure de l'expression de hTERT ».	259

4	Programme de cycles thermiques de RT-qPCR pour le test « Mesure de l'expression de <i>hTERT</i> ». N/A : non applicable.	260
5	Résultats de la spécificité du test de mesure de l'expression de <i>hTERT</i>. ND : non détecté.	262
6	Résultats de la sensibilité du test de mesure de l'expression de <i>hTERT</i>. Exp : expérience, # : numéro, ND : non détecté.	263
7	Résultats de la répétabilité du test de mesure de l'expression de <i>hTERT</i>. Tripl : triplicat, Moy : moyenne, * : triplicat invalidé. Les valeurs en gras sont inférieures au CV acceptable fixé à 2% pour les réactions de PCR (<i>intra-run</i>).	265
8	Résultats de la précision intermédiaire du test de mesure de l'expression de <i>hTERT</i>. Exp : expérience, Moy : moyenne. Les valeurs en gras sont inférieures au CV acceptable fixé à 3% pour les réactions de PCR (<i>inter-run</i>). Il est à noter que l'expérience 2 correspond au triplicat 1 utilisé pour l'analyse de la répétabilité.	267
9	Résumé de la validation du test « Mesure de l'expression de <i>hTERT</i> ».	269
10	Programme de cycles thermiques pour les 2 premières étapes du test « Mesure de l'activité de la télomérase » (élongation et PCR). N/A : non applicable.	273
11	Résultats du test de Bradford sur les échantillons HT1080 et BMMSC utilisés dans l'analyse du paramètre « sensibilité ».	275
12	Sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase », en termes de HT1080. # : numéro. Les valeurs en gras sont celles 3 fois supérieures au blanc.	276
13	Sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase », en termes de MG-63, A549 et U937. Les valeurs en gras sont celles 3 fois supérieures au blanc.	277
14	Comparaison de la sensibilité des tests « Mesure de l'expression de <i>hTERT</i> » et « Mesure de l'activité de la télomérase ».	277
15	Résultats de la précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (2% pour la précision <i>intra-run</i> de la PCR, 3% pour l' <i>inter-run</i> de la PCR et 20% pour l'ELISA).	278
16	Prévalence du mécanisme alternatif d'allongement des télomères dans 6 sous-types cancéreux (Christopher M. Heaphy et al. 2011 ; Henson & Reddel 2010).	283
17	Plasmides utilisés comme contrôles du test « Détection des mutations ALT ».	287

18	Amorces et sondes utilisées dans le test « Détection des mutations ALT ». Les séquences sont notées de 5' en 3'. # : numéro.	289
19	Composition du mélange de réaction qPCR pour le test « Détection des mutations ALT ».	290
20	Températures d'hybridation des amorces et sonde de chaque jeu, pour l'optimisation du test « Détection des mutations ALT ». Les températures d'hybridation ont été calculées via l'outil « OligoAnalyzer 3.1 » mis à disposition par la firme <i>IDT</i>	291
21	Résultats de l'analyse de spécificité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273H de <i>TP53</i>.	295
22	Résultats de l'analyse de spécificité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273C de <i>TP53</i>.	295
23	Résultats de l'analyse de sensibilité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273H de <i>TP53</i>.	298
24	Résultats de l'analyse de sensibilité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273C de <i>TP53</i>.	299
25	Comparaison des avantages, des inconvénients et de la résolution des quatre types de méthodes existant pour mesurer la longueur des télomères <i>in vitro</i> (Montpetit et al. 2014; Aubert et al. 2012; Vera & Blasco 2012; Jodczyk 2011).	303
26	Séquence des amorces sens et anti-sens pour l'amplification des répétitions télomériques et de l'albumine (Cawthon 2009). Les séquences sont notées de 5' en 3'.	310
27	Composition des mélanges de réaction qPCR <i>singleplex</i> pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.	310
28	Programme de cycles thermiques de la qPCR <i>singleplex</i> pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.	311
29	Résultats préliminaires de la qPCR <i>singleplex</i>. Ce tableau présente la moyenne des résultats de 6 expériences indépendantes. ND : non détecté.	312
30	Résultats de plusieurs concentrations en <i>telg</i> et <i>telc</i>. Le Δ représente la soustraction des <i>Cp</i> de deux types d'échantillon. La concentration utilisée dans le protocole initial est mise en évidence en gras ([<i>telg</i>] = 1 000 nM; [<i>telc</i>] = 1 000 nM).	315
31	Résultats de la modification de la température d'hybridation des amorces sur l'amplification du produit télomérique.	317
32	Résultats de l'ajout d'un traitement à la RNase A lors de l'extraction d'ADN. ND : non détecté.	318

33	Influence du nombre de cellules utilisées dans l'extraction d'ADN sur le Cp de la réaction de qPCR. En gras, le nombre de cellules initialement utilisé dans le protocole d'extraction d'ADN (basé sur le protocole d'extraction d'ARN établi en tant que SOP chez <i>Celyad</i>).	320
34	Résultats de la qPCR <i>multiplex</i>. Les résultats présentés ont été obtenus en faisant la moyenne de trois expériences indépendantes.	321
35	Composition détaillée du mélange de qPCR utilisé par Cawthon (Cawthon 2009).	325
36	Répétabilité du test « Soft agar ». Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures à la SD limite de 20%.	342
37	Précision intermédiaire du test « Soft agar ». Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont celles inférieures à la SD limite de 20%.	342
38	Composition détaillée du CryoStor® CS10 (StemCell Technologies n.d.).	349
39	Composition détaillée de la solution de Hartmann (Drug.com 2015).	349
40	Composition détaillée du <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) (Scientific 2015).	349
41	Composition détaillée de l'Advanced <i>Minimum Essential Medium</i> (Ad-MEM) (ThermoFisher Scientific 2015).	350
42	Composition détaillée du <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) (Cell Culture 2011).	351
43	Résultats de la précision <i>inter-run</i> de l'étape PCR du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Prod : produit d'amplification, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé pour les réactions de PCR (3%).	354
44	Résultats de la précision <i>inter-run</i> de l'étape ELISA du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Répl : réplicat, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).	355
45	Résultats de la précision <i>intra-run</i> de l'étape ELISA du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Pl : plaque, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).	356
46	Résultats de la précision <i>intra-run</i> globale du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Exp : expérience, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).	357
47	Composition du mix de la réaction de qPCR <i>multiplex</i> pour le test « Mesure de la longueur des télomères ».	358

48	Programme de cycles thermiques de la qPCR <i>multiplex</i> pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.	359
49	Evolution du PDT (<i>Population Doubling Time</i>) au fur et à mesure des passages pour les lots C-Cure® analysés.	363

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur René Rezsöhazi pour avoir accepté d'être mon promoteur académique et pour son accompagnement tout au long de cette belle aventure qu'est le mémoire. Vos remarques avisées et vos conseils toujours bienveillants m'ont permis de m'épanouir dans le travail réalisé pendant l'année écoulée.

Le second acteur important de ce mémoire est l'entreprise *Celyad*, que je voudrais chaleureusement remercier de m'avoir accueilli pour me permettre de réaliser mon travail de fin d'études dans un environnement professionnel, parfaitement adapté au cadre entrepreneurial de mon mémoire. Au sein de *Celyad*, je remercie plus particulièrement l'équipe du département de « Recherche et Développement » (R&D) pour son soutien dans la réalisation de mon travail quotidien. Un grand merci également à Sébastien Mauën, mon promoteur scientifique chez *Celyad*. Ton exigence m'a poussée à donner le meilleur de moi-même et j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Merci aux autres membres de l'équipe de R&D, et plus généralement à l'ensemble des employés de *Celyad*, d'avoir créé une atmosphère à la fois « bon enfant » et propice au travail, au sein des bureaux et des laboratoires.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire AMCB de l'UCL, autant les étudiants chercheurs que les Professeurs à la tête de ces sections de recherche, pour avoir pris part aux différents séminaires que j'ai présentés. Plus particulièrement, merci aux Professeurs Bernard Knoops et Patrick Dumont, pour avoir accepté de relire ce mémoire scientifique et de participer à l'aboutissement de mon travail de mémoire via le séminaire de fin de cursus.

Mes remerciements vont également à Robin et Antoine, qui ont suivi les péripéties des expériences en laboratoire et qui m'accompagnent dans la construction de l'histoire entrepreneuriale liée à ce mémoire scientifique.

Finalement, je souhaiterais remercier mes parents et mon cercle d'amis proches, pour leur soutien et pour avoir fait de mon aventure universitaire une vraie richesse.

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i>
APB	<i>ALT-associated PML bodies</i>
ASB-PCR	<i>Allele-specific PCR with a blocking reagent</i>
BIR	<i>Break-induced replication</i>
BMMSC	<i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i>
C-Cure®	<i>Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure</i>
Cp	<i>Crossing point</i>
cPD	<i>Cumulative population doubling</i>
CV	Coefficient de variation
DDR	<i>DNA damage response</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
ΔOD	<i>Delta of optical density</i>
ELISA	<i>Enzyme-like immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European medicine agency</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
hPL	<i>Human platelet lysate</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
ICH	<i>International conference on harmonisation</i>
IDT	<i>Integrated DNA technologies</i>
iPS	<i>Inducent pluripotent stem cell</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>
Moy	Moyenne
N/A	Non applicable
ND	Non détectable
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDT	<i>Population doubling time</i>
Q-FISH	<i>Quantitative fluorescence in situ hybridisation</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>

RT-qPCR	<i>Reverse transcription qPCR</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SIPS	<i>Stress-induced premature senescence</i>
SMe	<i>Selection medium</i>
SOP	<i>Standard operating procedure</i>
STELA	<i>Single telomere elongation length analysis</i>
R²	<i>Coefficient de détermination</i>
T_m	<i>Melting temperature</i>
TRF	<i>Terminal restriction fragment</i>
WT	<i>Wild type</i>

I Introduction

I.A Thérapie cellulaire et *Celyad*

I.A.1 Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire régénérative est une thérapie visant à régénérer un organe/tissu par l'injection *in vivo* de matériel cellulaire après leur manipulation *ex vivo* (U.S. Food and Drug Administration 2014). L'origine et l'identité de ce matériel peuvent cependant varier. Il existe deux catégories de thérapie cellulaire humaine : autologue et allogénique (Houssin 2015). En thérapie allogénique, les cellules sont prélevées chez un individu et injectées dans un ou plusieurs patients différents. La thérapie autologue, quant à elle, consiste à prélever et injecter des cellules chez le même patient (U.S. Food and Drug Administration 2014 ; Malik 2012). En fonction de la catégorie considérée, la cytothérapie peut s'effectuer avec :

- des cellules différenciées. Celles-ci peuvent être modifiées génétiquement (thérapie génique) ou reprogrammées pour générer des cellules souches pluripotentes, appelées iPS (*Induced Pluripotent Stem cells*) (National Institutes of Health n.d. ; EuroStemCell 2015). Ces deux types cellulaires peuvent être utilisés en thérapie allogénique et autologue.
- des cellules souches embryonnaires, qui sont plus couramment utilisées en thérapie allogénique ;
- des cellules souches somatiques. Elles représentent le matériel initial le plus utilisé en cytothérapie, tant au niveau allogénique qu'autologue. On les retrouve notamment chez l'adulte, les deux réservoirs principaux étant la moelle osseuse et le tissu adipeux (U.S. Food and Drug Administration 2014 ; Houssin 2015 ; Schwartz n.d.).

I.A.2 C-Cure®

Ce mémoire a été réalisé en partenariat avec *Celyad* (anciennement *Cardio3 Biosciences*), une entreprise active dans le secteur de la thérapie cellulaire. Depuis 2007, les équipes de *Celyad* travaillent au développement d'une thérapie cellulaire autologue basée sur l'utilisation de cellules souches adultes : C-Cure® (*Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE*). Brièvement, cette thérapie consiste en la différenciation de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BMMSCs) en cellules cardiopoïétiques et en leur injection dans une zone cardiomyopathique (Celyad 2015 ; Bartunek et al. 2013). C-Cure® est destiné à traiter l'insuffisance cardiaque chronique et d'origine ischémique (Bartunek et al. 2013).

I.A.2.1. Insuffisance cardiaque

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité (31% des morts leur ont été attribué au niveau mondial en 2012) (Celyad 2015). Les maladies cardiaques peuvent être divisées en deux catégories selon l'origine de leur déclenchement :

- les maladies d'origine ischémique sont dues à un défaut d'apport de sang au muscle cardiaque ;
- les maladies d'origine non-ischémique sont causées par des phénomènes comme l'hypertension ou des troubles métaboliques.

Si elle n'est pas traitée, une maladie cardiovasculaire peut mener à l'insuffisance cardiaque, une condition pathologique caractérisée par une diminution de la capacité du cœur à pomper le sang, causant une mauvaise circulation de celui-ci dans l'ensemble du corps (Celyad 2015 ; MedLinePlus 2013 ; Ligue Cardiologue Belge n.d.).

L'analyse de la prévalence des différentes causes de maladies cardiovasculaires (Figure 1) révèle que l'insuffisance cardiaque est dans une grande partie des cas d'origine ischémique (46% chez l'homme, 38% chez la femme) (Ligue Cardiologue Belge n.d. ; Celyad 2015 ; Wong 2014). Dans ce cas, on parle de maladie coronarienne artérielle. Les artères coronariennes se trouvent à la surface du cœur et sont donc chargées de lui fournir les apports énergétiques (notamment les nutriments et l'oxygène) suffisants à son bon fonctionnement. La maladie coronarienne artérielle se manifeste par la formation d'une ou de plusieurs plaques d'athérosclérose au sein de ces artères, diminuant ainsi leur diamètre. Ceci entraîne une diminution (voire une suppression) du flux sanguin au sein d'une zone du myocarde, provoquant la mort cellulaire programmée des cellules qui le composent, les cardiomyocytes (infarctus) (Bartunek et al. 2013 ; U.S. Department of Health and Human Services 2014 ; Beckermann 2014 ; Myerburg & Castellanos 2012). Parce qu'il s'agit de l'élément contractile du cœur, une diminution de la zone myocardique active entraînera inévitablement une diminution de la fonction de pompe de cet organe : c'est l'insuffisance cardiaque.

L'insuffisance cardiaque a également des conséquences à l'échelle de la cellule. En effet, alors qu'elle provoque le déclenchement de l'apoptose dans une partie des cardiomyocytes, elle peut également modifier l'histologie et la fonctionnalité des unités contractiles restantes. Ainsi, plusieurs études ont montré que les cardiomyocytes infarctés ont une longueur plus élevée au repos, mais surtout qu'ils présentent des dysfonctionnements du couplage excitation-contraction-relaxation suite à des altérations des flux de calcium. Lorsqu'un potentiel d'action se déclenche au sein d'un cardiomyocyte sain, le calcium entre dans le cytosol par l'intermédiaire de canaux calciques

voltage-dépendants de type L (LTCC) et provoque un relargage massif de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique. La contraction se produit au fur et à mesure que le calcium se lie aux myofilaments. La cellule se relaxe ensuite grâce au recyclage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique (via la pompe SERCA) et à son expulsion en dehors de la cellule (principalement via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX). Une contractilité myocardique réduite est un marqueur général de l'infarctus. Plus précisément, les cardiomyocytes infarctés ont une magnitude de contraction réduite d'environ 30% et une durée de relaxation prolongée, également de 30%. Selon certaines études menées dans certains modèles animaux comme chez l'humain, ceci serait principalement causé par une répression du relargage de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique, ainsi qu'un ralentissement de son élimination hors du cytosol (Mørk et al. 2009 ; Holt et al. 1998 ; Petrovic 2004).

Quelle qu'en soit la cause, l'insuffisance cardiaque peut se manifester brutalement (arrêt cardiaque) et/ou être présente de manière prolongée. Dans le deuxième cas, on parlera d'insuffisance cardiaque chronique. Celle-ci se caractérise par une accumulation progressive de fibres collagènes interstitielles au sein du tissu cardiaque infarcté (Petrovic 2004). Dans cette condition, suite à une tentative de compensation de la perte de pompe du sang, le cœur s'essouffle et augmente de volume (MedLinePlus 2013 ; Celyad 2015).

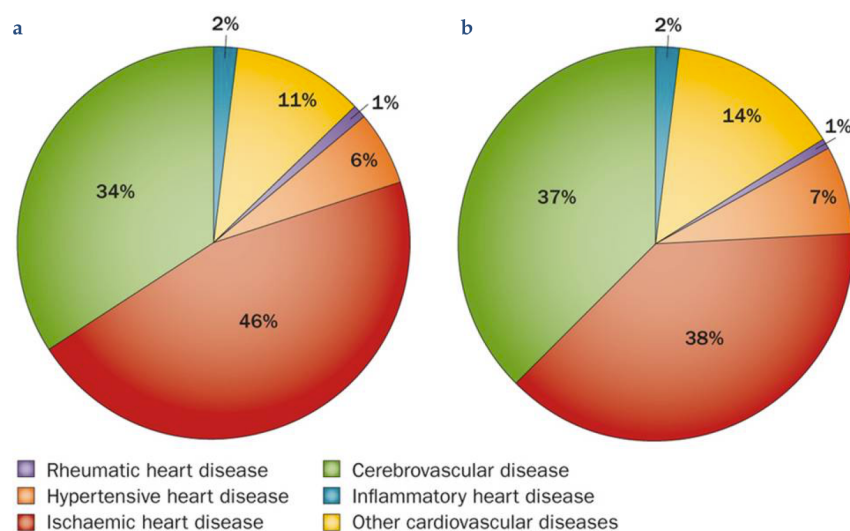


FIGURE 1 – Prévalence des différents types de maladies cardiovasculaires, en fonction du sexe (Wong 2014). Panel a, homme. Panel b, femme.

De nombreuses thérapies existent pour traiter les cardiomyopathies chroniques ischémiques. Cependant, aucune d'elles ne compense la perte de parenchyme cardiaque sous-jacente au développement et à la progression de cette pathologie (Bartunek et al. 2013). Avec l'arrivée de la thérapie cellulaire et notamment du développement de C-Cure® par *Celyad*, une nouvelle perspective de traitement de ce problème majeur a vu le jour.

I.A.2.2. Procédé de fabrication et de suivi de C-Cure®

Un échantillon de moelle osseuse est tout d'abord prélevé dans la partie supérieure de la hanche (crête iliaque). Comme mentionné précédemment, la moelle osseuse est un réservoir de cellules souches mésenchymateuses (BMMSCs), qui sont des progéniteurs non-hématopoïétiques et multipotents, capables de se différencier en cellules de multiples lignées d'origine mésodermale et ecto-mésenchymateuse (Bartunek et al. 2008).

L'échantillon de moelle osseuse est préalablement traité afin d'en lyser les globules rouges. Les BMMSCs sont ensuite isolées grâce à leurs propriétés adhésives. En effet, après une étape de congélation/décongélation, la moelle osseuse est mise en culture dans un milieu dit « de sélection » (SMe, consistant en un milieu de culture modifié dont la composition sera discutée dans la section II) supplémenté avec 5% de lysat plaquettaire humain (hPL). Après 24 heures, les composants non-adhérents de la moelle osseuse et les débris cellulaires sont éliminés ; les BMMSCs ont adhéré à la surface de la flasque (Bartunek et al. 2013). Les cellules souches mésenchymateuses représentent un très faible pourcentage des cellules nucléées de la moelle osseuse (environ 0,01%) (Bartunek et al. 2008). Après isolation, les BMMSCs doivent donc être amplifiées. Pour cela, elles sont cultivées sur 14 jours et 2 passages (SMe/5% hPL), ce qui permet d'obtenir plusieurs dizaines de millions de cellules (Bartunek et al. 2013).

L'étape cruciale du procédé de fabrication de C-Cure® consiste en l'entrée des BMMSCs dans la voie de différenciation cardiaque. Pour induire ce phénomène, les cellules souches mésenchymateuses sont exposées à un mélange confidentiel de facteurs de croissance cardiogéniques pendant 5 jours (Bartunek et al. 2013). Ce mélange récapitule les composants du sécrétome de l'endoderme ventral embryonnaire (au centre duquel se trouve le $TNF\alpha$), nécessaire à l'induction cardiogénique du mésoderme antéro-latéral embryonnaire. Par le programme classique de cardiopoïèse (que l'on qualifiera de « guidée » dans ce cas), ce mélange permet d'amorcer la différenciation cardiaque des cellules souches mésenchymateuses. Les facteurs qui le composent ont pour effet d'activer l'expression et la translocation nucléaire de facteurs de transcription (Bartunek et al. 2013) tels que NKX2.5 (NK2 homeobox 5), MEF-2C (Myocyte-specific Enhancer Factor 2C) et GATA4 (GATA binding protein 4), étape cruciale

pour s'engager définitivement dans la voie de différenciation cardiaque (Behfar et al. 2007 ; Behfar et al. 2008). L'utilisation de la cardiopoïèse guidée a mené à l'identification d'un nouveau phénotype cellulaire : la cellule cardiopoïétique. Il s'agit d'un type cellulaire intermédiaire, possédant certaines caractéristiques typiques d'une cellule souche (parmi celles-ci, l'activité mitotique et la capacité de prolifération sont particulièrement importantes dans le cadre d'une régénération du parenchyme cardiaque), mais en pleine acquisition d'une « structure cardiaque progressivement mature », caractérisée par l'expression de protéines myofibrillaires comme l'actinine- α , par la sarcomérogenèse (c'est-à-dire le processus de différenciation et d'organisation du réticulum sarcoplasmique) ainsi que par l'expression de la machinerie permettant le couplage excitation-contraction-relaxation tels que les canaux et pompes calciques. Les cellules cardiopoïétiques possèdent la capacité de générer du muscle cardiaque de novo (Behfar et al. 2007 ; Behfar et al. 2008).

Après obtention de cellules cardiopoïétiques, une dernière expansion cellulaire est réalisée pour obtenir au minimum 650 millions de cellules. Après une étape de congélation - décongélation, celles-ci sont finalement injectées dans la zone myocardique à l'aide d'un cathéter développé par *Celyad* (C-Cath_{ez}®) (Celyad 2015 ; Bartunek et al. 2013).

Avant la commercialisation de C-Cure®, différentes études doivent être menées chez l'animal pour évaluer le devenir des cellules cardiopoïétiques une fois injectées. Celles-ci sont importantes pour déterminer l'efficacité et la sécurité du produit de thérapie cellulaire. L'étude du devenir de C-Cure® *in vivo* comprend (U.S. Food and Drug Administration 2013) :

- l'évaluation du taux de survie ;
- l'évaluation de la distribution du produit, les cellules ayant un potentiel inhérent à migrer vers des sites autres que l'organe/tissu cible. Parmi diverses méthodes, *Celyad* utilise le marquage des cellules par le SPIO (*SuperParamagnetic Iron Oxide*) pour suivre leur localisation après injection (résonance magnétique) ;
- l'évaluation de la différenciation et de l'intégration des cellules, qui peuvent être influencées par le micro-environnement local. Des caractéristiques comme la morphologie et le phénotype sont analysées ;
- l'évaluation de la tumorigénicité, c'est-à-dire la capacité à induire la formation d'une tumeur.

I.A.3 Release testing

I.A.3.1. Généralités

Avant l'injection d'un produit biopharmaceutique au patient, plusieurs tests doivent être réalisés sur le produit afin de s'assurer de sa conformité ; on parle alors de *release testing* ou de tests de *release*. Le *release* d'un produit est soumis à de nombreuses règles, établies par les organismes de régulation en vigueur tels que l'EMA (*European Medicine Agency*) et la FDA (*Food and Drug Administration*). Ainsi, six caractéristiques du produit obtenu après processus de fabrication doivent être vérifiées (U.S. Food and Drug Administration 2014) :

- l'identité, qui consiste à confirmer que le produit contient l'agent thérapeutique souhaité ;
- la viabilité, critère propre au secteur de la thérapie cellulaire. Il consiste à analyser le pourcentage de cellules vivantes dans le produit final ;
- la potentialité, c'est-à-dire la mesure de l'efficacité du produit thérapeutique ;
- la stérilité, particulièrement importante dans le cas de produits injectables ;
- la pureté, consistant, dans le cas de la thérapie cellulaire, à valider qu'aucun type cellulaire indésirable n'est présent dans le produit ;
- la sécurité. Ce dernier paramètre consiste à vérifier que le produit final de thérapie cellulaire est sans danger pour le patient et par exemple, qu'il ne contient pas de cellules aux propriétés tumorales. Dans ce cas, on en évalue l'absence de potentiel tumorigène, c'est-à-dire de capacité à former une tumeur ou un cancer (tumeur maligne) *in vivo*.

I.A.3.2. Transformation des cellules souches mésenchymateuses

L'évaluation de la sécurité en thérapie cellulaire est un critère important dans le cadre du *release* de C-Cure®. En effet, plusieurs études ont décrit un rôle potentiel des cellules souches mésenchymateuses dans la formation de tumeurs *in vivo* (Houghton et al. 2004 ; Mohseny et al. 2009) ; elles seraient donc tumorigènes. De plus, d'autres groupes de recherche (Rubio, Rosland) ont rapporté que, lorsqu'elles sont cultivées peuvent un laps de temps étendu, ces cellules peuvent acquérir une certaine instabilité génétique et suivre le processus de transformation en cellules tumorales (Rubio et al. 2005 ; Røslund et al. 2009). En contraste avec ces résultats, d'autres auteurs rapportent que, bien que les cellules souches mésenchymateuses développent des anomalies chromosomiques lorsqu'elles sont cultivées sur une longue période, aucune preuve de leur entrée en tumorigenèse n'a été observée (Tarte et al. 2010 ; Y. Wang et al. 2013). Dans le prolongement de cette dernière observation, deux rapports discréditent les résultats

obtenus dans les études de Rubio (Rubio et al. 2005) et Rosland (Røsland et al. 2009) et évoquent une possible contamination de leurs cultures par des cellules malignes (Garcia et al. 2010 ; Torsvik et al. 2010).

En résumé, bien que la notion de transformation des cellules souches mésenchymateuses ait été discréditée par de récentes investigations, la question reste toujours à l'étude. Quoi qu'il en soit, l'analyse des échantillons de C-Cure® pour en vérifier l'absence de potentiel tumorigène est obligatoire d'un point de vue réglementaire.

I.A.3.3. Utilisation du caryotype pour évaluer la sécurité

Pour vérifier l'absence de potentiel tumorigène dans les échantillons de C-Cure®, le caryotype est traditionnellement utilisé par *Celyad*. Il s'agit d'un des tests les plus reconnus par les autorités européennes pour évaluer la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire (Barkholt et al. 2013).

Le caryotype consiste en une représentation visuelle des chromosomes et est obtenue à partir d'une cellule en mitose (métaphase). Après séparation, les chromosomes sont soumis à une coloration, dont les plus couramment utilisées sont le G-banding et R-banding, qui permettent de distinguer l'hétéro- de l'euchromatine et confèrent donc à chaque paire de chromosomes un motif particulier. Une fois les paires organisées, on obtient la carte d'identité chromosomique de la cellule (National Genetics and Genomics Education Center n.d.). Cette technique permet d'observer les anomalies chromosomiques majeures (aneuploïdies, délétions, translocations, ...) et est donc une mesure de l'instabilité génomique au niveau macroscopique. L'instabilité génomique est définie comme une tendance accrue à l'acquisition d'altérations dans le génome pendant le cycle de vie d'une cellule. Suite à une défaillance de la cellule parentale à distribuer le matériel génétique de manière équivalente dans les cellules filles, celles-ci peuvent subir des mutations, des amplifications, délétions ou réarrangements de segments de chromosomes ou encore des pertes ou gains de chromosome(s) entier(s). L'accumulation de ces altérations génomiques au cours des divisions cellulaires peut provoquer un dysfonctionnement de la cellule, menant à la formation d'une tumeur (Shen 2011 ; Chin et al. 2011). Dès lors, puisqu'il permet d'observer les altérations génomiques, le caryotype est utile pour une analyse en amont des mécanismes de tumorigénicité.

Cependant, en tant que test de *release* pour confirmer l'absence de potentiel tumorigène des échantillons de C-Cure®, cette méthode est insuffisante. En effet, elle se base sur un mécanisme non-universel de tumorigénicité. Elle peut ainsi générer des faux négatifs : une cellule au caryotype normal peut posséder des caractéristiques tumo-

rigènes à cause de la présence d'altérations génomiques à l'échelle de la séquence, non détectables par cette technique. De plus, la sensibilité minimale du test est relativement faible. En effet, pour être considérée comme clonale, une anomalie chromosomique doit être observée dans au moins 2 cellules différentes sur un total de minimum 20 cellules mitotiques analysées (European Cytogeneticists Association 2012), ce qui résulte en une sensibilité minimale de 10%.

Afin de confirmer ou infirmer l'absence de potentiel tumorigène des échantillons issus de la thérapie cellulaire, des alternatives fiables au caryotype doivent donc être développées, sur base de marqueurs spécifiques des cellules tumorales.

I.B Marqueurs du cancer

Les marqueurs du cancer, listés à l'initiative de Douglas Hanahan et Robert Weinberg, représentent un petit nombre de caractéristiques moléculaires, biochimiques ou cellulaires acquises par les cellules durant les nombreuses étapes de leur transformation en tumeur maligne (Hanahan 2000 ; Hanahan & Weinberg 2011). Ainsi, elles sont partagées par la majorité des types cellulaires tumoraux humains. En 2000, six caractéristiques clés avaient été identifiées. Depuis, quatre autres ont été ajoutées à la liste. L'ensemble de ces marqueurs, présentés à la Figure 2, sont (Hanahan 2000 ; Hanahan & Weinberg 2011) :

- l'immortalité répliquative, mécanisme qui permet aux cellules tumorales de se diviser infiniment ;
- le déclenchement d'une réponse inflammatoire, elle-même promotrice du développement d'une tumeur suite à la libération de cytokines ;
- l'activation de l'invasion et de la métastase, ou la capacité des cellules tumorales à quitter leur site d'origine et à envahir les tissus voisins ou plus lointains ;
- l'induction de l'angiogenèse, le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants ;
- l'instabilité génomique, ou l'accumulation de mutations et/ou d'anomalies chromosomiques ;
- la résistance à l'apoptose, mort cellulaire programmée ;
- la dérégulation des systèmes énergétiques de la cellule ;
- une signalisation proliférative soutenue et une insensibilité aux suppresseurs de croissance. Ces deux marqueurs sont à l'origine du caractère incontrôlable de la prolifération des cellules tumorales ;
- la protection contre l'action des cellules du système immunitaire, qui empêche donc la destruction des cellules tumorales.

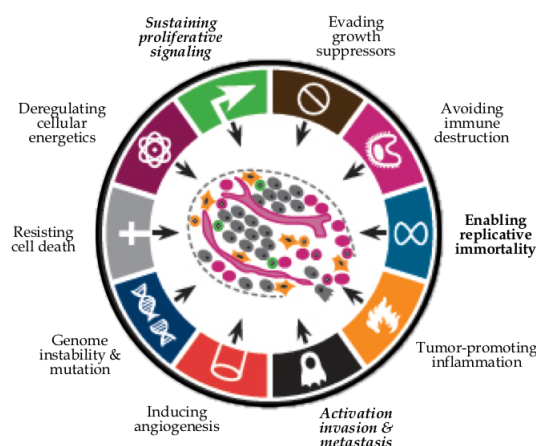


FIGURE 2 – Marqueurs du cancer, tels que proposés par Hanahan et Weinberg en 2011 (figure retravaillée à partir de (Hanahan & Weinberg 2011)).

Dans le cadre d'un développement analytique réalisé sur des échantillons de C-Cure®, quatre de ces marqueurs ne peuvent pas être pris en considération.

Tout d'abord, alors que la protection contre une destruction immunitaire et la dérégulation des systèmes énergétiques cellulaires sont des caractéristiques propres aux cellules tumorales, elles sont également applicables aux cellules souches mésenchymateuses se trouvant à la base du processus de fabrication de C-Cure®. En effet, les cellules souches mésenchymateuses sont capables d'échapper au système immunitaire, que ce soit grâce au manque d'expression de molécules de surface spécifiques ou par une action inhibitrice qui a pour effet de supprimer la fonction et la prolifération des lymphocytes T et B ainsi que les cellules NK (*Natural Killers*) (Machado et al. 2013 ; Ankrum et al. 2014). En ce qui concerne la dérégulation de l'énergétique cellulaire, l'exemple le plus tangible est celui du métabolisme du glucose. Différentes études (dont une réalisée au sein de *Celyad*) ont montré que les cellules souches mésenchymateuses métabolisent le glucose de manière exarcerbée, principalement grâce à l'augmentation de la glycolyse (Shaw 2006 ; Annibaldi & Widmann 2010). Trois autres marqueurs du cancer ne peuvent pas être utilisés dans la cadre d'une application à C-Cure® : l'induction de l'angiogenèse, le déclenchement d'une réponse inflammatoire et la signalisation proliférative soutenue. Alors qu'une réponse inflammatoire est déclenchée par l'injection de C-Cure®, l'induction de l'angiogenèse et la prolifération cellulaire soutenue font partie des mécanismes d'action des cellules cardiopoïétiques (Zhang et al. 2013 ; Behfar et al. 2008 ; Behfar et al. 2007).

Nous avons également décidé de ne pas sélectionner le marqueur « instabilité génomique » dans le cadre de ce mémoire. En effet, il s'agit du marqueur sur le-

quel se base le caryotype. Or, comme nous l'avons mentionné dans la section I.A.3.3, le manque de fiabilité de ce test provient notamment du fait que l'accumulation d'anomalies chromosomiques, responsable de l'instabilité génomique de la cellule, n'est pas un mécanisme universel de tumorigénicité.

Enfin, le marqueur de résistance à la mort cellulaire programmée a été écarté pour l'ambiguïté que ses résultats pourraient générer. En effet, un échantillon qui contient des cellules mortes peut également contenir des cellules non tumorales. A l'inverse, un échantillon au sein duquel aucune cellule n'est apoptique n'est pas forcément tumoral.

Dans ce mémoire, trois des marqueurs listés par Hanahan et Weinberg ont donc été sélectionnés :

- l'immortalité répllicative, parce qu'il s'agit d'un marqueur universel des cellules tumorales et d'une étape inévitable lors du processus de tumorigénèse ;
- l'activation de l'invasion et de la métastase et l'insensibilité aux suppresseurs de croissance, que nous regrouperons sous le terme de « croissance indépendante de l'ancrage ». La sélection de ce marqueur s'inscrit dans la continuité d'un précédent projet mené chez *Celyad* pour le développement d'une méthode analytique. Ce test est décrit à l'Annexe 1.

I.C Sénescence et immortalité répllicative

I.C.1 Sénescence répllicative

Hayflick et Moorhead sont les premiers à avoir observé que des cellules primaires (c'est-à-dire qui sont directement cultivées à partir de leur tissu d'origine) ne prolifèrent pas indéfiniment. En effet, leur capacité proliférative est caractérisée par trois phases. La première phase correspond à une période de faible expansion cellulaire, avant le premier passage. Une fois la culture établie, la deuxième phase consiste en une prolifération rapide. Finalement, durant la troisième phase, la prolifération diminue progressivement jusqu'à complètement s'arrêter (Hayflick & Moorhead 1961).

Le mécanisme cellulaire à l'origine de cette troisième phase est appelé « sénescence répllicative » (Kuilman et al. 2010 ; Campisi 1997). Il s'agit d'un mécanisme irréversible limitant le nombre de fois que les cellules peuvent se diviser et étant *de facto* considéré comme un mécanisme suppresseur de tumeur *in vivo* (Deng & Chang 2007).

Dans la littérature, la sénescence répllicative est distinguée de la sénescence accélérée induite par le stress (SIPS) (Suzuki & Boothman 2008). Bien que ces phénomènes soient

causés par des facteurs différents, le mécanisme d'activation est dans les deux cas identique (Deng & Chang 2007 ; Toussaint et al. 2000). En effet, l'arrêt de prolifération cellulaire est avant tout le résultat de l'érosion des extrémités chromosomiques (appelées « télomères ») à chaque division. La perte progressive d'ADN télomérique déclenche une réponse de dommages à l'ADN (DDR, pour *DNA Damage Response*), point de départ de la sénescence répllicative. La réponse DDR peut également être déclenchée par une série de facteurs cellulaires internes comme l'activation de signaux mitogéniques (oncogènes), une perturbation structurale de la chromatine ou des dommages génomiques divers (Naesens 2011 ; Rodier & Campisi 2011). Dans le cas de la SIPS, l'activation de la réponse DDR est due à l'exposition de la cellule à divers stress comme des radiations ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Suzuki & Boothman 2008 ; Toussaint et al. 2000).

I.C.2 Structure des télomères

Les télomères sont les extrémités physiques des chromosomes des eucaryotes. Ils sont composés de séquences désoxyribonucléiques répétées (chez l'humain, le bloc répétitif est, de 5' en 3', TTAGGG) et non-codantes. Alors que la majeure partie du télomère (2-20 kb) consiste en un double brin, l'extrémité 3' (50-500 nucléotides) est composée d'un simple brin riche en G. Cette configuration particulière permet au télomère d'adopter une structure stabilisante en lasso, dans laquelle l'extrémité 3' du télomère se replie pour former une « *D-loop* » (structure désoxyribonucléique dans laquelle les deux brins d'une molécule d'ADN double brin sont séparés par un troisième brin d'ADN). L'ensemble de la structure télomérique est appelée « *T-loop* » (Neumann & Reddel 2002 ; Neidle & Parkinson 2003 ; Deng & Chang 2007 ; Pfeiffer & Lingner 2013 ; Diotti & Loayza 2011) (Figure 3).

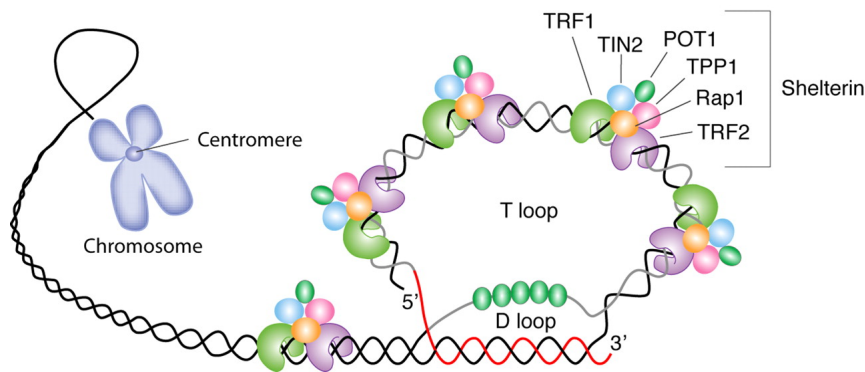


FIGURE 3 – Structure télomérique (Calado & Young 2008).

Comme la Figure 3 le montre également, les séquences télomériques sont liées à un complexe protéique appelé le « complexe *shelterin* ». Celui-ci est composé de six polypeptides et s'assemble aux endroits où les répétitions TTAGGG sont sous forme de double brin. Les protéines TRF1 et TRF2 (*Telomeric Repeat Factors*) sont à l'origine de cet assemblage, puisque ce sont elles qui se fixent sur l'ADN. Ces protéines recrutent ensuite RAP1 (*Ras-related Protein 1*), TIN2 (*TERF1-Interacting Nuclear Factor 2*), TPP1 (*Tripeptidyl Peptidase 1*) et POT1 (*Protection Of Telomeres 1*) (Deng & Chang 2007 ; Diotti & Loayza 2011 ; Palm & de Lange 2008). Cet ensemble protéique exerce plusieurs fonctions au sein de la cellule :

- Il intervient dans la fonction télomérique. En effet, ce complexe dynamique possède un large réseau d'interactants et est gouverné par des événements de modifications post-traductionnelles susceptibles d'endommager la structure des télomères et/ou d'activer des mécanismes en lien direct avec la biologie des télomères (Diotti & Loayza 2011 ; Xin et al. 2008) ;
- La configuration particulière d'un télomère et du complexe qui l'entoure a également pour but d'empêcher son élongation (Diotti & Loayza 2011) par des mécanismes divers, dont nous discuterons dans la section I.C.5 ;
- Tout comme la structure en « *T-loop* », le complexe *shelterin* est aussi un moyen de stabilisation et de protection des télomères (Diotti & Loayza 2011 ; Palm & de Lange 2008). Ainsi, ce complexe protéique limite la dégradation de l'ADN, la recombinaison et la fusion aberrante des extrémités chromosomiques suite aux mécanismes de recombinaison par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, pour *Non-Homologous End Joining*) et de recombinaison homologue (*HR-mediated repair of telomeric DNA*) (Deng & Chang 2007) ;
- Finalement, ce complexe joue un rôle dans la définition de l'architecture nucléaire (Diotti & Loayza 2011).

I.C.3 Mécanisme de raccourcissement des télomères

La sénescence répliquative est liée à la biologie des télomères. En effet, au fur et à mesure des divisions, les télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une longueur critique, déclencheur de la sénescence répliquative (Kuilman et al. 2010 ; Deng & Chang 2007 ; Podlevsky & Chen 2012 ; Murnane 2012).

Le raccourcissement des télomères est un phénomène inévitable lié aux capacités intrinsèques de la machinerie de réplication de l'ADN (Figure 4). Lors de la phase S du cycle cellulaire, la réplication commence par l'action de l'hélicase, chargée de créer la fourche de réplication en séparant les deux brins d'ADN. La primase a ensuite pour fonction de synthétiser des courts fragments d'ARN servant à amorcer l'action de l'ADN Polymérase III. En débutant aux amorces fabriquées par la primase, l'ADN Polymérase III réalise alors la synthèse du complémentaire de chaque brin d'ADN. Contrairement au brin avancé (*leading strand*) où la synthèse d'ADN est continue, l'action de la polymérase est régulièrement interrompue sur le brin retardé (*lagging strand*). Les fragments obtenus suite à ce fonctionnement discontinu sont appelés fragments d'Okazaki. Une fois la synthèse d'ADN terminée, l'ADN Polymérase I (fonction exonucléase 5'-3') élimine les amorces d'ARN et les remplace par de l'ADN. Les espaces générés sont finalement refermés par la ligase (Kornberg & Baker 2005 ; Biology/Medicine Animations HD 2014).

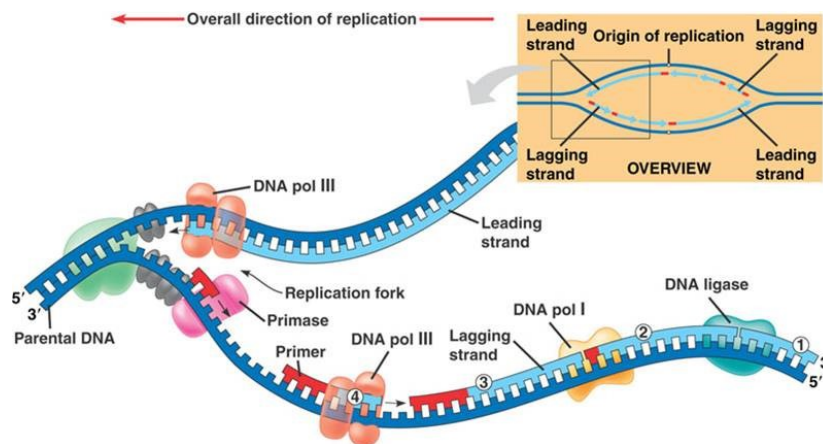


FIGURE 4 – Problème de réplication aux extrémités chromosomiques (Cong et al. 2002).

Toutefois, l'ADN Polymérase I exerce une action unidirectionnelle et est incapable d'effectuer la synthèse d'ADN sans amorce en 5'. Dès lors, les extrémités chromosomiques se raccourcissent pendant la réplication. En effet, les amorces placées aux deux extrémités télomériques seront supprimées mais ne pourront pas être remplacées par de l'ADN (Figure 5). L'action d'exonucléases (3'-5') a ensuite pour effet de partiellement supprimer la partie simple-brin présente aux extrémités du chromosome (Memorial

University of Newfoundland n.d.). Ainsi, il a été estimé que les télomères perdent de 30 à plusieurs centaines de paires de bases à chaque division cellulaire (Huffman et al. 2000).

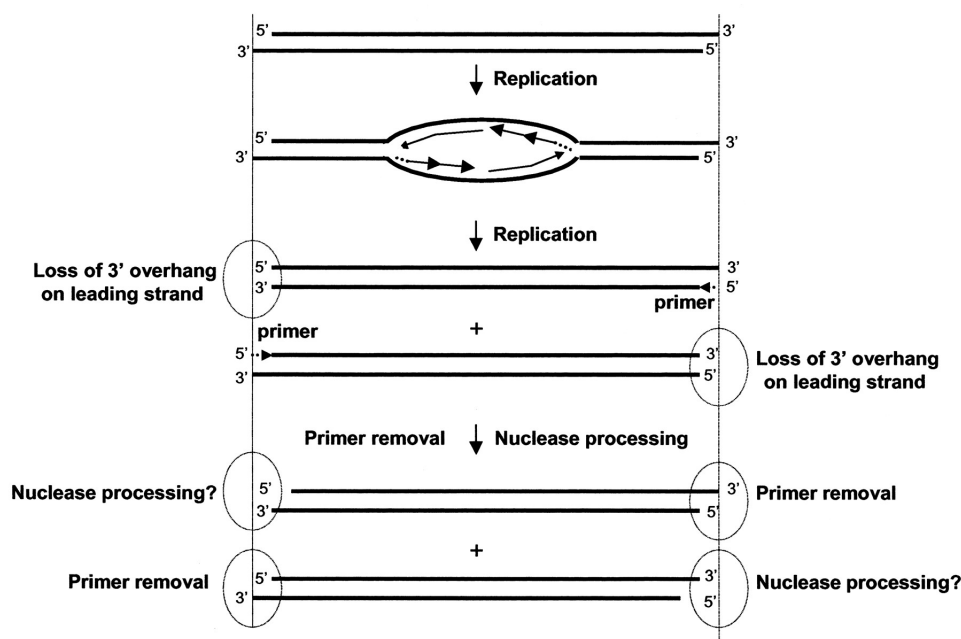


FIGURE 5 – Mécanisme de réplication eucaryote de l'ADN (University of Leicester 2010).

I.C.4 Activation du mécanisme de sénescence répllicative

Au fur et à mesure des divisions, les télomères se raccourcissent donc, et ce jusqu'à atteindre une longueur minimale critique, qui correspond à la perte de la structure en *T-loop* et la dissociation du complexe *shelterin*.

La disparition de ces structures protectrices provoque l'activation de la réponse de dommages à l'ADN (Figure 6) grâce à l'action de deux senseurs : le complexe MRN (composé de MRE11, RAD50 et NBS1), qui détecte les cassures double-brin et les complexes RPA (*Replication Protein A*) et 9-1-1 (composé de RAD9, RAD1 et HUS1), qui détectent les régions simple brin exposées. Ces trois complexes permettent le recrutement des kinases ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et ATR (*Ataxia-Telangiectasia Rad3-related*). Aux sites de dommages à l'ADN, ces kinases permettent indirectement le maintien et le renforcement du signal DDR en phosphorylant et en recrutant ainsi trois molécules : le variant d'histone γ H2AX, important pour le recrutement de MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint 1*), qui provoque l'accumulation du complexe MRN et l'activation d'ATM (Kuilman et al. 2010; Sulli et al. 2012); BRCA1 (*BRCA1 Associated gene 1*) (Wu et al. 2010); et 53BP1 (*TP53-Binding Protein 1*). ATM et ATR ont ensuite pour rôle de phosphoryler deux autres kinases : CHK1 (*CHeckpoint Kinase 1*) et CHK2 (*CHeckpoint Kinase 2*) (Kuilman et al. 2010; Murnane 2012; Sulli et al. 2012;

Chuaire-Noack et al. 2010).

L'activation de ces kinases permet au signal DDR de s'étendre au-delà de la zone lésée pour converger au niveau de deux effecteurs se situant en aval : TP53 (*Tumor Protein 53*) et la famille de phosphatases CDC25 (*Cell Division Cycle 25*) (Kuilman et al. 2010 ; Murnane 2012 ; Sulli et al. 2012 ; Chuaire-Noack et al. 2010).

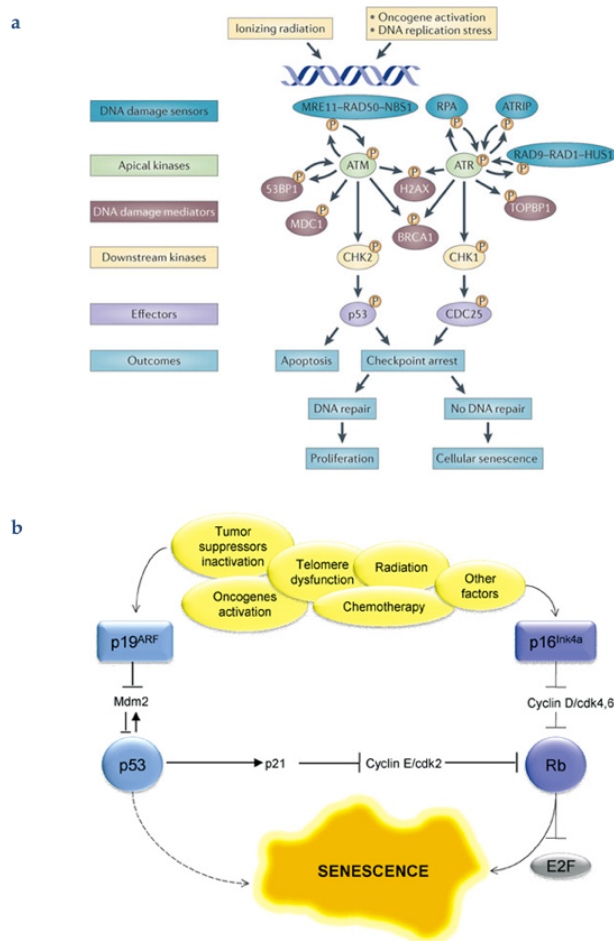


FIGURE 6 – Voie d’activation de la sénescence cellulaire. a, voie de réponse de dommages à l’ADN (DDR) (Sulli et al. 2012). b, mécanismes en aval de la DDR et mécanismes alternatifs d’activation de TP53 et RB (Chuaire-Noack et al. 2010).

L’activation de TP53 ne se fait pas uniquement par le biais du mécanisme DDR (Figure 6). En effet, elle peut également avoir lieu grâce à p19^{ARF} qui, en interagissant avec l’inhibiteur MDM2 (*Mouse Double Minute 2*), inactive celui-ci. Le suppresseur de tumeur PML (*ProMyelolytic Leukemia protein*) est un régulateur de l’acétylation de TP53 et peut aussi intervenir dans son inactivation. Que ce soit via p19^{ARF} ou via PML, l’activation de TP53 se traduit par sa stabilisation. Suite à cela, la protéine p21^{AF1/CIP1} (*CDK-Interacting Protein 1*) est activée et exerce alors sa fonction d’inhibition des kinases cyclines-dépendantes (CDK), et notamment du complexe cycline E/CDK2 formé pen-

dant la phase G1 du cycle cellulaire. Il est à préciser que, mis à part p21^{AF1/CIP1}, d'autres effecteurs de TP53 – comme 14-3-3 et GADD45, qui agissent en tant qu'inhibiteur de transition G2/M – sont impliqués dans la signalisation associée à la sénescence. Un autre inhibiteur de CDK est activé dans la voie de la sénescence répllicative : p16^{Ink4a} (*INhibitor of Kinase 4a*). Plus précisément, cette molécule est impliquée dans la répression des complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 lors de la transition G1/S du cycle cellulaire. Quoi qu'il en soit, l'inactivation des CDK mène à la déphosphorylation de RB (*RetinoBlastoma protein*), un facteur qui regagne alors sa capacité à former un complexe avec des membres de la famille E2F (*E2 Factor*) afin d'empêcher l'action de ces facteurs de transcription et ainsi d'arrêter le cycle cellulaire (Figure 6) (Deng & Chang 2007 ; Chuaire-Noack et al. 2010 ; Campisi & d'Adda di Fagagna 2007 ; Muñoz-Espín & Serrano 2014 ; Ben-Porath & Weinberg 2005).

Nous venons de discuter de plusieurs mécanismes d'activation de la sénescence. Il n'est pas encore clair si la cellule n'en utilise qu'un seul à la fois ou si ceux-ci sont utilisés simultanément. Cependant, la persistance et l'intensité des dommages à l'ADN ainsi qu'une augmentation de l'expression de p16^{Ink4a} semblent à l'heure actuelle indispensables pour que la cellule subisse un arrêt irréversible de prolifération (Kuilman et al. 2010 ; Chuaire-Noack et al. 2010).

I.C.5 Immortalité répllicative

Il existe deux mécanismes contrecarrant le raccourcissement des extrémités télomériques à chaque division cellulaire : la télomérase reverse transcriptase (hTERT) et un mécanisme alternatif, appelé « *Alternative Lengthening of Telomeres* » (ALT) (Deng & Chang 2007 ; Neumann & Reddel 2002 ; Pfeiffer & Lingner 2013 ; Podlevsky & Chen 2012 ; Silvestre et al. 2011 ; Henson et al. 2002 ; Nabetani & Ishikawa 2011 ; Cesare & Reddel 2010). Ces mécanismes permettent de rallonger les télomères à la fin de chaque phase S du cycle cellulaire et sont naturellement actifs dans les cellules qui effectuent un grand nombre de divisions comme les cellules souches embryonnaires, les cellules germinales, les lymphocytes activés et certaines cellules souches adultes (Meyerson 2000 ; Hiyama & Hiyama 2007 ; Samassekou et al. 2010). S'ils atteignent un certain niveau d'activité, ces mécanismes mènent à l'acquisition d'une capacité illimitée de prolifération ; c'est l'immortalisation cellulaire (Cong et al. 2002).

I.C.5.1. Télomérase

La télomérase reverse transcriptase (hTERT, citée ci-après sous la dénomination de télomérase) est une ADN Polymérase spécialisée dans l'ajout de répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes (Podlevsky & Chen 2012). Cette enzyme est constituée

de 2 sous-unités principales :

- la sous-unité catalytique TERT (*TElomerase Reverse Transcriptase*), qui contient la transcriptase inverse nécessaire à la synthèse d'ADN (Podlevsky & Chen 2012 ; Sandin & Rhodes 2014) ;
- la sous-unité TER (*TElomerase RNA*), qui contient de l'ARN (Podlevsky & Chen 2012 ; Sandin & Rhodes 2014). La télomérase est en effet une ADN Polymérase ARN-dépendante, c'est-à-dire qu'elle utilise de l'ARN comme guide pour la synthèse d'ADN (Pfeiffer & Lingner 2013).

Bien que la télomérase puisse exister sous plusieurs états conformationnels, son assemblage en homodimère est essentiel pour son fonctionnement (Sandin & Rhodes 2014). Pour exercer sa fonction d'allongement des télomères, la télomérase est tout d'abord recrutée à leur extrémité 3' simple brin (Figure 7). A cet endroit, l'ADN télomérique est protégé par POT1, un composant du complexe shelterin. POT1 interagit avec TPP1, une autre protéine de ce complexe qui interagit directement avec la télomérase (via la sous-unité TERT). L'interaction entre TPP1 et POT1 permet donc le recrutement de la télomérase au bout des télomères (Sandin & Rhodes 2014 ; Nandakumar & Cech 2013).

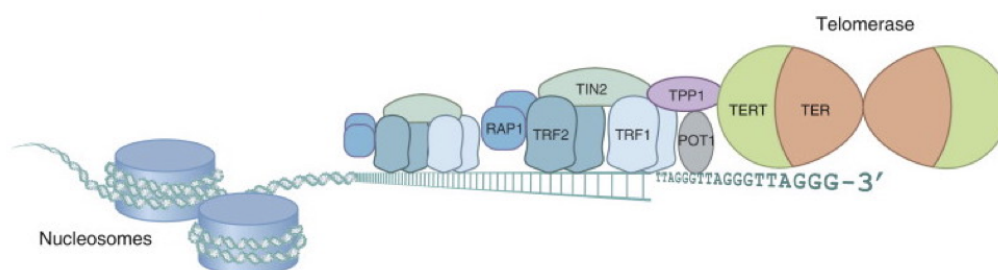


FIGURE 7 – Mécanisme de recrutement de la télomérase aux extrémités télomériques (Sandin & Rhodes 2014).

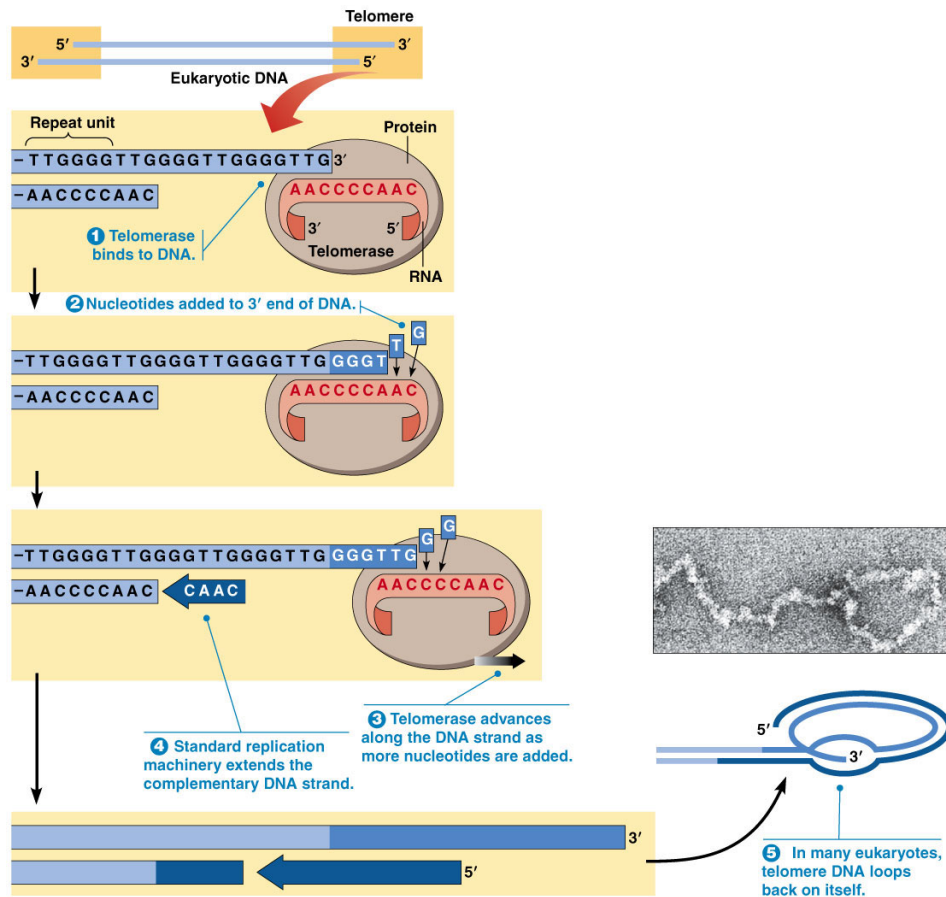


FIGURE 8 – Mécanisme d'action de la télomérase (Memorial University of Newfoundland n.d.).

Une fois recrutée aux extrémités télomériques, la télomérase peut agir selon le mécanisme présenté à la Figure 8. Tout d'abord, les 30 dernières bases de l'extrémité 3' simple brin du télomère sont positionnées dans le site actif de la sous-unité TERT et alignées avec la séquence de l'ARN guide de la sous-unité TER. La deuxième étape consiste en l'élongation de la séquence télomérique simple brin, puisque des nucléotides sont ajoutés de 5' en 3' sur base de la séquence ribonucléique guide (Sandin & Rhodes 2014).

L'action de la télomérase est dite « itérative » ou « processive ». Cela signifie que, une fois l'extrémité 3' du télomère étendue jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN guide TER, la télomérase peut repositionner le substrat au début (extrémité 3') de l'ARN guide TER et continuer l'ajout de nucléotides (Pfeiffer & Lingner 2013; Podlevsky & Chen 2012).

Une fois l'action de la télomérase achevée, les enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN synthétisent une partie du brin complémentaire à celui qui vient d'être allongé (Memorial University of Newfoundland n.d.).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré qu'une activation de la télomérase résultait en l'immortalisation de la cellule et l'apparition de tumeurs (Hahn et al. 1999 ; Harley et al. 1994 ; Shay et al. 2001). En effet, le maintien de la longueur des télomères permet à la cellule d'échapper à l'activation de la sénescence répllicative, mécanisme suppresseur de tumeur. La télomérase est l'enzyme dont l'activité se trouve à la base du mécanisme d'allongement des télomères le plus fréquemment utilisé par les cellules tumorales, puisqu'on le retrouve dans 80-90% des tumeurs humaines (Deng & Chang 2007).

I.C.5.2. *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT)

C'est au début des années 2000, suite à l'observation que des cellules ne démontrant pas d'activité télomérase sont capables de garder des télomères de longueur constante pendant plusieurs doublements, que l'existence probable d'un ou plusieurs autres mécanismes d'allongement des télomères a été évoquée (Henson et al. 2002). Ceux-ci ont été nommés « *Alternative Lengthening of Telomeres* » (ALT).

Bien que les bases moléculaires d'un mécanisme indépendant de la télomérase soient pour l'instant incertaines, plusieurs modèles ont été formulés. La majorité des études publiées sont cependant en faveur d'un principe de recombinaison homologue entre répétitions télomériques, similaire à la réponse BIR (*Break-Induced Replication*) (Nabetani & Ishikawa 2011 ; Cesare & Reddel 2010 ; Murray & Carr 2008 ; Verdun & Karlseder 2007). Il a été ainsi été postulé que l'extrémité 3' d'un ADN simple brin (dans le cas des télomères, il s'agit de la queue flottante terminale) envahit une région (contenue dans un autre télomère) possédant une séquence homologue. La synthèse d'ADN est ensuite initiée en utilisant le brin paillé comme guide (Figure 9) (Henson et al. 2002 ; Verdun & Karlseder 2007).

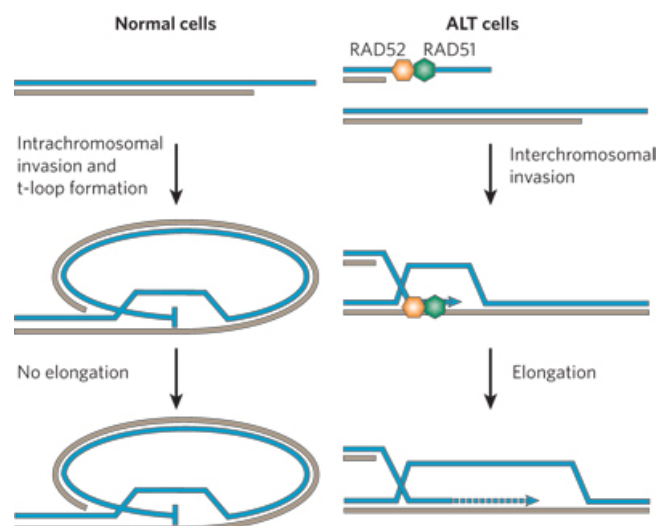


FIGURE 9 – Modèle de recombinaison homologue impliqué dans le mécanisme ALT d’allongement des télomères (Verdun & Karlseder 2007).

Le mécanisme alternatif d’allongement des télomères est associé à plusieurs caractéristiques phénotypiques au sein de la cellule, ce qui permet une identification rapide et aisée des cellules ALT-positives. Ces particularités sont :

- La présence d’ADN télomérique hétérogène : on y retrouve des télomères très courts (< 2 kb) et très longs (>50 kb) (Henson et al. 2002 ; Cesare & Reddel 2008 ; Subhawong et al. 2009). La dynamique d’allongement des télomères dans les cellules ALT-positives est en effet très complexe, puisque des élongations et délétions rapides ont lieu simultanément et en même temps qu’une attrition des télomères qui se déroule à la même vitesse que dans des cellules normales (Cesare & Reddel 2008). Cette hétérogénéité fait que la longueur totale des télomères est plus élevée dans les lignées cellulaires ALT (Buczkowicz et al. 2014).
- La présence d’ADN télomérique extra-chromosomique, qui serait une conséquence de l’utilisation de la recombinaison homologue. Cet ADN peut être linéaire ou circulaire (dans ce cas, ils sont nommés « *t-circles* ») (Henson et al. 2002 ; Cesare & Reddel 2008 ; Subhawong et al. 2009).
- La présence d’APBs (*ALT-associated PML Bodies*) (Cesare & Reddel 2008 ; Subhawong et al. 2009). Il s’agit de corps nucléaires contenant du matériel télomérique (associé au complexe *shelterin*). De plus, les APBs contiennent plusieurs facteurs de réparation de l’ADN, de réplication et de recombinaison, ainsi que les composants classiques des corps nucléaires comme les protéines PML et SP100. Plusieurs études sont en faveur d’un modèle où les APBs sont le siège de l’activité ALT (Cesare & Reddel 2008).

Bien que ces caractéristiques soient spécifiques à ALT, le lien entre celles-ci et le

fonctionnement même de l'allongement alternatif des télomères n'a pas encore clairement été établi (Cesare & Reddel 2008).

Finalement, mentionnons que ce mécanisme est utilisé par 5-10% des cellules tumorales, avec une prévalence élevée dans les sarcomes (tumeurs d'origine mésenchymateuse (Xiao et al. 2013)) (70% en moyenne) (Christopher M. Heaphy et al. 2011 ; Henson & Reddel 2010).

II Objectifs

Dans le cadre de l'évaluation de l'absence de potentiel tumorigène d'un produit de thérapie cellulaire, l'utilisation du caryotype ne fournit pas une information complète pour confirmer ou infirmer cette absence. Comme discuté dans l'introduction de notre travail, il se base en effet sur un mécanisme non-universel de tumorigénicité : l'instabilité génomique au niveau macroscopique. De ce fait, le caryotype peut générer des faux négatifs (comme des faux positifs). De plus, la sensibilité minimale de ce test (10%) est relativement faible.

Des tests portant sur des mécanismes moléculaires se situant en aval de l'accumulation d'altérations génomiques et présents à l'échelle microscopique pourraient donc renforcer le critère « sécurité » en *release*. Ainsi, l'objectif de ce mémoire a été de développer et/ou valider plusieurs méthodes analytiques répondant à ces besoins, dans le but de vérifier l'absence de potentiel tumorigène des échantillons issus de la thérapie cellulaire (et, plus précisément, de C-Cure®). De plus, pour présenter un réel avantage scientifique, ces tests doivent répondre à deux critères : ils doivent être fiables/pertinents, et leur sensibilité doit être supérieure au caryotype.

Le critère de fiabilité/pertinence implique que ces tests doivent pouvoir être utilisés seuls pour s'assurer qu'un lot de thérapie cellulaire est exempt de cellules tumorales. Il est donc indispensable de baser nos recherches sur un marqueur tumoral universel. Pour répondre à cet objectif, l'immortalité répliquative a été sélectionnée puisqu'elle répond à cet impératif. Nous avons donc travaillé sur quatre méthodes analytiques, concernant des aspects différents et complémentaires de ce mécanisme :

- « Mesure de l'expression de *hTERT* » par qPCR, qui fera l'objet d'une validation afin de confirmer que la procédure utilisée pour ce test est fiable, reproductible et appropriée pour l'utilisation qui en est faite ;
- « Mesure de l'activité de la télomérase » par PCR et ELISA, qui fera l'objet d'un développement dont le but est de mettre au point la méthode ;
- « Détection des mutations ALT » par qPCR, qui fera l'objet d'un développement ;
- « Mesure de la longueur des télomères » par qPCR, qui fera l'objet d'un développement.

De plus, parce qu'il s'agit d'une méthode bien établie mais surtout dans le but de poursuivre une étude entamée chez *Celyad*, ce mémoire a également fait l'objet d'un travail sur le test « Soft agar », basé sur la croissance indépendante de l'ancrage. Cette méthode analytique fera l'objet d'une seconde phase de développement et est décrite dans l'Annexe 1.

III Matériel et méthodes de culture cellulaire

La plupart des méthodes utilisées dans ce mémoire font l'objet de procédures opérationnelles standards (SOPs, pour *Standard Operating Procedures*) propres chez Celyad. Il s'agit d'instructions écrites permettant d'uniformiser la performance d'une fonction dans un secteur bien précis (dans notre cas, d'une manipulation en laboratoire). Dans ce document, les procédures incrémentées d'une SOP sont marquées par un astérisque (*).

Dans cette section, seules les procédures de culture cellulaire utilisées dans ce mémoire sont décrites. Ces étapes sont préliminaires à la réalisation des tests lors de leur phase de développement et/ou de validation. La composition détaillée des différentes solutions utilisées est précisée dans l'Annexe 2. Les procédures spécifiques à chaque test seront évoquées dans la section qui leur est propre.

III.A Décongelation*

Dans le cadre de ce mémoire, toutes les cultures ont été initiées au départ de cellules préalablement isolées, cultivées et cryopréservées dans du CryoStor® CS10 (*StemCell Technologies*, #07930). Le CryoStor® CS10 est un milieu de préservation contenant 10% de DMSO (di-méthyl sulfoxyde) et offrant un environnement de protection pour les cellules lors des processus de congélation et de stockage à de très basses températures (*StemCell Technologies* n.d.).

Chaque ampoule est placée dans un bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation quasi complète de la suspension (environ 1 minute et 30 secondes). Celle-ci est ensuite diluée (ratio 20 :1 v/v) dans une solution de Hartmann (B. Braun, #401744)/5% HSA (*Human Serum Albumin*) (*Octapharma*, #C145A6671), permettant ainsi de réduire les effets cytotoxiques du DMSO à température ambiante. Après centrifugation à 800 g pendant 5 minutes et à température ambiante, le culot obtenu est resuspendu dans un volume adéquat de milieu de culture (SMe), afin de permettre le comptage des cellules.

III.B Comptage*

Pour le comptage, la suspension cellulaire est mélangée à du Bleu Trypan 0,4% (*Sigma-Aldrich*, #72-57-1) (ratio 1:1 v/v). Vingt microlitres de cette suspension sont ensuite ajoutés à une cellule de Bürker pour procéder au comptage. L'hémocytomètre est composé de 9 grands carrés de 1x1 mm chacun. L'opérateur détermine le nombre de cellules vivantes (incolores) et non-vivantes (bleues) dans un minimum de 3 carrés (minimum 100 cellules) sur la diagonale, à l'aide d'un microscope (grossissement 200x)

et d'un compteur manuel. Les formules suivantes sont alors utilisées pour calculer la viabilité de l'échantillon :

— *Nombre de cellules viables par mL :*

$$\frac{\text{Total du nombre de cellules viables}}{\text{Nombre de carrés comptés}} \times 20000 \times \text{Dilution effectuée}$$

— *Nombre total de cellules viables :*

$$\text{Nombre de cellules viables par mL} \times \text{Volume de suspension cellulaire}$$

— *Viabilité (%) :*

$$\frac{\text{Nombre total de cellules viables}}{\text{Nombre de cellules comptés}} \times 100$$

III.C Cycle de culture cellulaire

III.C.1 Ensemencement*

Les cellules peuvent être mises en culture dans des flasques de différentes tailles correspondant à des surfaces de culture de 175, 75 ou 25 cm² (T175, T75 ou T25). Les échantillons cellulaires sont cultivés dans une solution contenant du milieu de sélection (SMe) et du lysat plaquettaire humain (hPL) (*Mill Creek Life Sciences*, #507.287.6257).

Le SMe est un milieu nutritif composé d'AdMEM (Advanced Minimum Essential Medium) (Gibco, #041-96259M) implémenté de 1% v/v de glutamax 100x (Gibco, #35050-038), de 0,04% v/v d'héparine 5 000 U/mL (LEO Pharma) et de 1% v/v d'un cocktail d'antibiotiques (pénicilline 10.000 U/mL et streptomycine 10.000 µg/mL) (Pen/Strep) (Gibco, #15140-122). Il est important de mentionner que ce mélange d'antibiotiques n'est ajouté que pour les cultures réalisées dans le département « Recherche et Développement » et n'intervient pas dans le procédé de C-Cure®.

Le hPL est un substitut du sérum foetal bovin (FBS) et contient les facteurs nécessaires à la stimulation de la croissance des cellules. Les échantillons issus du processus de C-Cure® étant destinés à une réinjection chez le patient, le remplacement du FBS par du lysat plaquettaire humain évite d'utiliser un produit d'origine animale, avec tous les risques qu'il peut comporter pour le patient. La solution SMe/hPL contient 2,5 ou 5% v/v de hPL, en fonction du type de culture, de test et du passage de C-Cure®.

Dans la plupart des cas, l'ensemencement est réalisé avec une densité allant de 4 000 à 6 000 cellules/cm² dans un volume de 160 µL/cm². Une fois les cellules semées, les flasques sont placés dans un incubateur à 37°C/5% CO₂.

III.C.2 Confluence*

La confluence correspond au niveau de recouvrement de la surface de culture par des cellules adhérentes cultivées en monocouche. Celle-ci est évaluée au microscope (grossissement 100x) et à 5 endroits de la flasque. Chaque région se voit attribuer un score allant de 0 (correspondant à des cellules individualisées, sans connexions les unes aux autres) à 5 (correspondant à un recouvrement complet de la flasque et une superposition des cellules par endroits). La somme de ces scores représente la confluence totale de la flasque, convertie en pourcentage de recouvrement selon les règles présentées au Tableau 1.

Tableau 1 – Correspondance des scores et pourcentages de confluence.

SCORE DE CONFLUENCE	RECOUVREMENT DE LA FLASQUE (%)
< 3	< 60
3-7	≈ 60
8-12	≈ 70
13-15	≈ 80
16-18	≈ 85
19-21	≈ 90
22-23	≈ 95
> 23	≈ 100

III.C.3 Changement de milieu*

Tous les quatre jours, pour autant que la confluence ne dépasse pas 85 ± 5%, le milieu (SMe/hPL) de la flasque est remplacé (avec un pourcentage v/v de hPL identique à la solution précédente).

III.C.4 Trypsinisation*

Si la confluence est supérieure ou égale à 85 ± 5%, le passage des cellules est initié. Les volumes de trypsine et de SMe pour chaque flasque sont précisés dans le Tableau 2. Pour ce faire, la séquence suivante est réalisée :

- La solution SMe/hPL de la flasque est enlevée ;

- Le tapis cellulaire est délicatement lavé avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (*Gibco*, #041-96259M) (80 μ L par cm^2 de flasque) afin d'éliminer toute trace de SMe et de hPL ;
- La trypsine (0,05% trypsine-EDTA 1x) (*Gibco*, #25300-054), préalablement chauffée à $37 \pm 2^\circ\text{C}$, est ajoutée à la flasque et on laisse celle-ci agir pendant 3 minutes dans l'incubateur à $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$;
- L'activité de la trypsine est neutralisée par ajout de SMe (ions divalents) et les cellules dissociées y sont resuspendues ;
- La flasque est rincée par ajout de SMe, qui est ajouté à la suspension cellulaire obtenue à l'étape précédente ;
- La suspension récupérée est centrifugée à 400 g pendant 5 minutes et à température ambiante ;
- Le culot obtenu après centrifugation est resuspendu dans un volume adéquat de SMe pour procéder au comptage (voir section III.B) ;
- En fonction du besoin, les cellules récupérées sont semées dans une nouvelle flasque (voir section III.C.1) ou congelées (voir section III.C.5 ci après).

Tableau 2 – Volumes de trypsine et de SMe (neutralisation et rinçage) nécessaires au passage.

TYPE DE FLASQUE	SURFACE (cm^2)	VOLUME DE TRYPSINE (mL)	VOLUME DE SMe (mL)
T175	175	5	5 + 4
T75	75	2	4 + 2
T25	25	1	2 + 1

III.C.5 Congélation*

Les échantillons cellulaires (culots secs obtenus après centrifugation d'une suspension cellulaire à 400 g pendant 5 minutes et à température ambiante et élimination du surnageant) sont suspendus dans 500 μ L de CryoStor® CS10. Les ampoules sont ensuite placées dans un Mr Frosty™ (*ThermoScientific*, #5100-0001) préalablement refroidi à $2-8^\circ\text{C}$. L'isopropanol contenu dans ce dernier permet une diminution lente de la température des ampoules ($1^\circ\text{C}/\text{minute}$) quand il est placé à une température inférieure à -60°C , ce qui empêche la formation de cristaux responsable de la rupture des membranes plasmiques et garde ainsi la majorité des cellules intactes. Finalement, les échantillons sont stockés à une température inférieure à -60°C ou dans l'azote liquide ($< -120^\circ\text{C}$), selon qu'ils sont ultérieurement destinés à des étapes de préparation (ADN, ARN, protéines) ou à des cultures cellulaires.

IV Validation de méthodes analytiques

IV.A Mesure de l'expression du gène *hTERT*

IV.A.1 Principe

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la majorité des cellules tumorales (80-90%) utilisent la télomérase pour maintenir leurs télomères à une longueur constante au fil des divisions. Le premier test qui a fait l'objet de ce mémoire a donc consisté à déterminer le niveau d'expression du gène codant pour cette enzyme dans les échantillons destinés à la thérapie cellulaire.

Pour analyser l'expression du gène de la télomérase reverse transcriptase humaine (*hTERT*), la technique de RT-qPCR est ici utilisée. Celle-ci, dont le matériel initial est de l'ARN extrait à partir de cellules en culture, consiste en deux étapes successives (Figure 10) :

- Une étape de transcription inverse (RT, pour *Reverse Transcription*), qui permet de copier l'ARN en ADNc (ADN complémentaire) (Langevin et al. 2013) ;
- Une étape de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*), lors de laquelle des amorces et une sonde sont utilisées. Les amorces permettent l'amplification des molécules d'ADNc correspondant au gène de la télomérase (qPCR) et la sonde permet la détection des amplicons. En effet, la sonde consiste en une séquence complémentaire à une partie de celle de *hTERT*, et est associée à un fluorophore (en vert sur la Figure 10) et à un *quencher* (en rouge sur la Figure 10). Ce dernier absorbe la lumière émise par le fluorophore lorsque la sonde est entière. Lorsque la séquence correspondant au gène *hTERT* est amplifiée par la polymérase Tth, la sonde est détruite, ce qui libère le fluorophore qui n'est donc plus soumis à l'effet inhibiteur du *quencher*. L'émission de fluorescence est proportionnelle au nombre de copies d'ARN présent au départ dans l'échantillon, et donc au niveau d'expression de la télomérase (qPCR). Le résultat d'une qPCR est caractérisé par un indice, le Cp (*Crossing Point*), qui correspond au nombre de cycles d'amplification à partir duquel la fluorescence s'élève au-delà du bruit de fond. Plus cette valeur est faible, plus le nombre de copies d'ARN est élevé (Parida et al. 2008 ; Langevin et al. 2013 ; Cold Spring Harbor Laboratory (DNA Learning Center) n.d. ; Biosistemika n.d.).

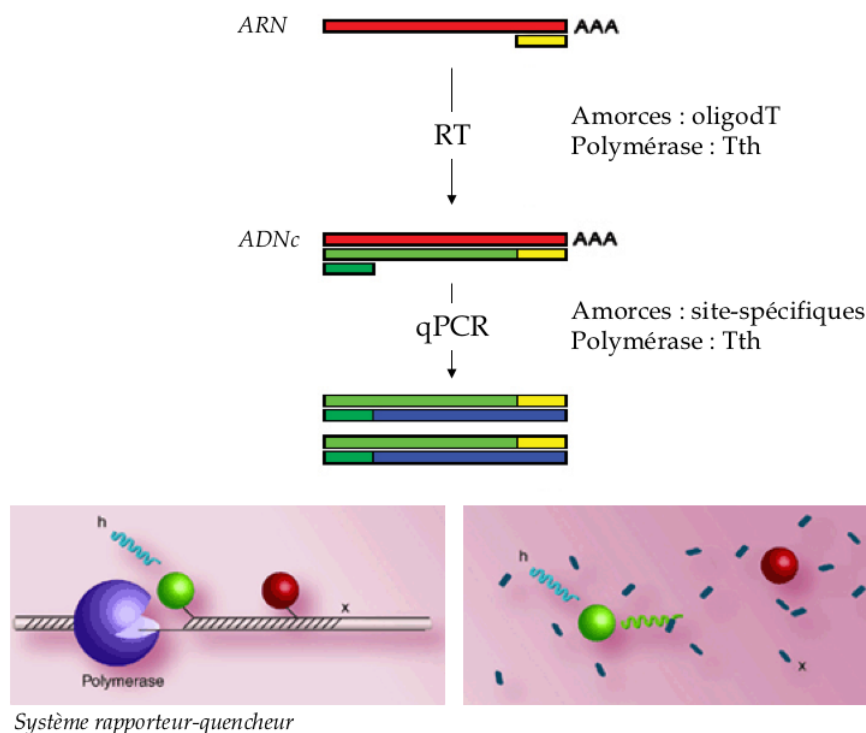


FIGURE 10 – Principe de qPCR utilisé pour le test de mesure de l'expression de la télomérase (figure créée sur base de (Parida et al. 2008) et (Langevin et al. 2013)).

Dans le test « Mesure de l'expression de *hTERT* », la RT et la qPCR ne sont pas réalisées de manière séquentielle, mais bien au sein d'un même puits (*one-step RT-qPCR*) grâce à l'utilisation d'une enzyme (Tth) qui possède à la fois les fonctions de transcriptase inverse et de polymérase.

Afin de normaliser l'expression de *hTERT*, l'expression d'un gène de référence doit également être évaluée. Le gène de la cyclophiline A (ou *PPIA*, pour *Peptidyl-Prolyl Isomerase A*) a été sélectionné parmi plusieurs candidats, suite à une étude préliminaire au sein des laboratoires de *Celyad* qui a déterminé qu'il fait partie des gènes les plus stablement exprimés tout au long du procédé de C-Cure®.

Dans ce test, les séquences correspondant à la télomérase et à la cyclophiline A sont co-amplifiées au sein d'une même réaction ; on parle de réaction *multiplex* (par opposition au *singleplex*, où les deux produits sont amplifiés séparément). L'utilisation du *multiplex* présente plusieurs avantages principaux :

- Il permet de normaliser les différences de concentrations d'échantillon nucléaire et d'éliminer l'erreur due au pipetage, ce qui a pour effet de diminuer la variation entre l'amplification des deux produits (Jodczyk 2011) ;
- Cela réduit les quantités de réactifs nécessaires (Jodczyk 2011) ;

- L'utilisation du *multiplex* permet d'ajouter un contrôle interne à la réaction, étape imposée par la pharmacopée européenne dans le cadre de la création d'un test de diagnostic *in vitro* (Broeders et al. 2014).

Afin de permettre la co-amplification de *hTERT* et de *PPIA* au sein du même puits, deux couples fluorophore/*quencher* différents sont utilisés (qPCR bichromatique) :

- Pour *hTERT*, le Texas Red (émission : 615 nm (Atdbio n.d.)) est couplé au *quencher* BHQ-2 (absorption : 560-670 nm (BioSearch Technologies n.d.)) ;
- Pour *PPIA*, le FAM (émission : 518 nm (Atdbio n.d.)) est couplé au *quencher* BHQ-1 (absorption : 480-580 nm (BioSearch Technologies n.d.)).

IV.A.2 Matériel et méthodes

IV.A.2.1. Echantillons cellulaires et spiking

Deux types cellulaires de référence ont été utilisés pour le développement et la validation de cette méthode :

- Les cellules souches mésenchymateuses naïves (BMMSCs) issues d'une banque générée par *Celyad* sont utilisées en guise d'échantillons négatifs, c'est-à-dire n'exprimant pas la télomérase (Zimmermann et al. 2003) ;
- La lignée tumorale MG-63 est utilisée comme contrôle positif du test. Il s'agit d'une lignée issue d'un ostéosarcome humain (Pautke et al. 2004), connue pour exprimer *hTERT* (Yu et al. 2014).

Pour développer et valider ce test, des échantillons cellulaires contenant différentes proportions de MG-63 ont été préparés par *spiking*. Cette méthode consiste à mettre des cellules tumorales en présence de cellules négatives (préalablement à l'extraction d'ARN) qui, dans notre cas, sont les BMMSCs et permet donc de traiter des échantillons avec différentes proportions de cellules positives dans un fond constant.

IV.A.2.2. Extraction d'ARN*

Après décongélation (section III.C), des échantillons contenant 500 000 cellules sont centrifugés à 400g pendant 5 minutes à température ambiante. Les culots obtenus sont ensuite mis à sec en éliminant le surnageant.

En utilisant cette quantité cellulaire fixe, l'extraction d'ARN est alors réalisée grâce au kit « RNeasy Mini Kit » (*Qiagen*, #74104), basé sur l'utilisation d'une résine de silicates. La procédure est suivie sur base des instructions du fournisseur (QIAGEN n.d.). Au terme de l'extraction et de la purification des ARNs, ces derniers sont élués

par 50 μL d'eau *RNase free* fournie dans le kit. Si les échantillons d'ARN extrait ne sont pas utilisés immédiatement, ils sont conservés à une température inférieure à -60°C .

IV.A.2.3. Quantification d'ARN*

Une fois extrait, l'ARN est quantifié au NanoDrop® ND-1000 (*ThermoScientific*). Ce spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution (dans la gamme UV-Vis) et en détermine la concentration en ARN sur base de la formule suivante (Research Gate n.d.) :

$$1 \text{ unité OD}_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$$

Le ratio des absorbances mesurées aux longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté de l'ARN extrait, et doit être proche de 2 (Research Gate n.d.). Le blanc est réalisé avec l'eau *RNase Free* utilisée pour l'élution de l'ARN.

IV.A.2.4. Réactions de RT-qPCR

- *Contrôles*

Deux types de contrôles de RT-qPCR servent au test « Mesure de l'expression de *hTERT* » :

- Le contrôle négatif de la réaction est l'eau *PCR grade* ;
- Les contrôles positifs servant à la vérification de l'amplification de *hTERT* et de *PPIA* sont des plasmides contenant la séquence de chaque gène.

- *Préparation des contrôles positifs externes*

Deux contrôles positifs sont utilisés pour ce test : un plasmide codant pour le gène *PPIA* (*Origene*, #SC111937) et un plasmide codant pour *hTERT* (*Origene*, #RC217436). Ceux-ci sont conditionnés dans de l'eau *PCR grade* pour obtenir une solution stock de 100 ng/ μL . Pour leur utilisation, les plasmides sont dilués de façon sériée dans une solution de Poly A (12,5 ng/ μL) (*Life Technologies*, #POLYA.GF) jusqu'à une concentration finale de 250 fg/ μL (dans un fond constant de Poly A).

- *Préparation des amorces et des sondes fluorescentes*

Le jeu d'amorces/sonde utilisé pour l'amplification de *hTERT* font partie d'un mélange commercial (*Applied Biosystems*, #Hs00162669-m1). Leurs séquences ne sont pas disponibles. Le jeu d'amorces/sonde utilisé pour la détection de *PPIA* a été conçu chez *Celyad* et fabriqué par la firme *Integrated DNA Technologies (IDT)*. Leurs séquences

sont confidentielles. Chaque amorce est diluée jusqu'à obtenir une concentration de 10 μM . La sonde est préparée dans un volume adapté de Tris-EDTA (*Sigma-Aldrich*, #93283) pour obtenir une solution stock à 100 μM , par la suite diluée à 2 μM .

- *Préparation du mix de la réaction de RT-qPCR*

Pour la préparation du mélange de réaction, le kit « LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes » (*Roche*, #04991885001) est utilisé. Le « Master mix » de ce kit contient l'ADN Polymérase Tth, le tampon de réaction ainsi qu'un mélange de dNTPs (où les dTTPs ont été remplacés par des dUTPs). L'activateur permet d'ajuster la concentration de $\text{Mn}(\text{OAc})_2$. Seize microlitres du mélange présenté au Tableau 3 sont ajoutés dans chaque puits d'une plaque 96-puits.

Tableau 3 – Composition du mélange de réaction de RT-qPCR pour le test « Mesure de l'expression de *hTERT* ».

RÉACTIF	QUANTITÉ (μL)	RÉFÉRENCE
Mélange commercial <i>hTERT</i>	1	<i>Applied Biosystems</i> , #Hs00162669-m1
<i>PPIA</i>	Amorce sens	<i>IDT</i>
	Amorce anti-sens	<i>IDT</i>
	Sonde (TxRed615)	<i>IDT</i>
Activateur	1,3	<i>Roche</i> , #04991885001
Master mix	7,4	<i>Roche</i> , #04991885001
H_2O PCR grade	3,3	<i>Roche</i> , #04991885001

- *Préparation des échantillons*

L'ARN extrait et quantifié selon la procédure décrite plus haut est dilué pour atteindre une concentration de 50 ng/ μL . Quatre microlitres de cette dilution sont ajoutés aux puits correspondant dans la plaque 96-puits. Chaque échantillon est analysé en triplicats.

- *Programme thermique de RT-qPCR*

Une fois le mélange de réaction et les échantillons disposés dans la plaque, celle-ci est placée dans le LightCycler 480 II (*Roche*). La rétrotranscription et l'amplification

sont réalisées selon le programme de cycles thermiques repris dans le Tableau 4.

Tableau 4 – Programme de cycles thermiques de RT-qPCR pour le test « Mesure de l'expression de *hTERT* ». N/A : non applicable.

PROGRAMME	NOMBRE DE CYCLES	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (HH:MM:SS)	MODE
RT	1	63	00:03:00	N/A
Amplification	45	95	00:00:15	N/A
		60	00:01:00	N/A
		72	00:00:01	Acquisition

IV.A.3 Développement préalable de la méthode analytique

Antérieurement à la réalisation de ce mémoire, une phase de développement et d'optimisation du test a été réalisée par les équipes de *Celyad*. Outre sa faisabilité, celle-ci a permis d'établir les spécifications de la méthode, c'est-à-dire les exigences qui doivent être remplies par chaque qPCR pour que le test soit considéré comme valide :

- Le contrôle négatif externe (*H₂O PCR grade*) doit être sans équivoque négatif pour l'expression de *hTERT* ;
- Au contrôle positif externe pour l'amplification de *hTERT* (plasmide *hTERT*) doit correspondre un *Cp* moyen compris dans l'intervalle $26,35 \pm 1$ cycles ;
- Au contrôle positif externe pour l'amplification de *PPIA* (plasmide *PPIA*) doit correspondre un *Cp* moyen compris dans l'intervalle $25,98 \pm 1$ cycles ;
- Les échantillons doivent présenter un *Cp* moyen pour l'amplification du gène de la cyclophiline A inférieur ou égal à 23,89 cycles ;
- La déviation standard (SD) d'un triplicat doit être inférieure à 0,5 cycles (IRIC n.d.).

IV.A.4 Validation de la méthode analytique

Comme l'ensemble des tests développés dans ce mémoire, la mesure de l'expression de la télomérase a été validée en tant que test limite. Il s'agit d'un test semi-quantitatif qui permet de déterminer si un échantillon contient une impureté ; la réponse donnée par ce genre de test étant de type binaire (« oui/non ») (Web Formulas 2015). Dans le cadre de la détection des cellules tumorales, la création d'un test limite est en effet suffisante. De plus, il n'existe aucune référence standard internationale pour la création d'un test quantitatif d'évaluation de la tumorigénicité. Pour qu'une méthode limite soit valide, la spécificité et la sensibilité doivent obligatoirement être analysées (ICH Guidelines 2005).

La validation du test « Mesure de l'expression de *hTERT* », réalisée dans le cadre de ce mémoire, a pour but de démontrer la fiabilité et la reproductibilité de cette méthode analytique. En tant que test limite, nous devons en outre prouver que la méthode est spécifique et calculer sa sensibilité (limite de détection). Cependant, pour la validation de cette méthode, deux paramètres supplémentaires ont été testés : la précision et la linéarité. Pour chaque paramètre, des critères d'acceptation ont été prédéfinis. La méthode sera considérée comme validée seulement si ces critères sont remplis.

IV.A.4.1. Spécificité

La spécificité d'une méthode est sa capacité à détecter de manière non équivoque l'analyte en présence d'autres composants (ICH Guidelines 2005). Autrement dit, dans notre cas, il s'agit de la capacité du test de distinguer une cellule exprimant *hTERT* (et donc potentiellement tumorale) d'une cellule n'exprimant pas ce gène.

Pour être valide, la spécificité doit répondre aux critères suivants :

- L'expression de *hTERT* est non détectable pour les BMMSCs ;
- L'expression de *hTERT* dans une population pure de MG-63 est caractérisée par un Cp moyen inférieur à 35 ;
- L'expression de *hTERT* dans une population contenant 5% de MG-63 est caractérisée par un Cp moyen inférieur à 35.

Les résultats présentés au Tableau 5 sont en accord avec les spécifications évoquées ci-dessus et la spécificité du test est donc validée.

IV.A.4.2. Sensibilité

L'évaluation de la sensibilité d'une méthode consiste à déterminer sa limite de détection (LOD, pour *Limit Of Detection*). Il s'agit de la plus petite quantité d'analyte qui peut être fiablement détectée mais pas nécessairement quantifiée en valeur exacte (ICH Guidelines 2005). Dans le cadre de la création d'un test limite, la limite de détection est cruciale puisqu'elle permettra de dire si un échantillon est considéré comme *hTERT* positif ou négatif.

Tableau 5 – Résultats de la spécificité du test de mesure de l'expression de *hTERT*. ND : non détecté.

Echantillon			Amplification <i>hTERT</i>	
TYPE	PROPORTION BMMSCs (%)	PROPORTION MG-63 (%)	C _P	SD
BMMSCs	100	0	ND	ND
MG-63	0	100	29,13	0,02
<i>Spiking</i> MG-63/BMMSCs	95	5	32,36	0,14

En effet, si la valeur obtenue pour cet échantillon est supérieure à la LOD, celui-ci est considéré comme exprimant *hTERT* et le produit de thérapie cellulaire associé ne pourra pas être injecté.

Pour valider la sensibilité de ce test, 11 expériences indépendantes ont été réalisées, les échantillons étant testés en triplicats dans chaque expérience. Des échantillons *spikés* contenant de 0,25% à 2,5% MG-63 ont été utilisés. Ainsi, pour être valide, la limite de détection doit répondre au critère suivant : l'expression de *hTERT* pour une proportion donnée de MG-63 dans un fond cellulaire constant doit être détectable dans tous les réplicats.

Selon les résultats obtenus (Tableau 6), la sensibilité validée du test correspond à 1% de MG-63. Cela signifie que, lorsque l'échantillon contient 1% de MG-63, le résultat est considéré comme supérieur au bruit de fond.

Tableau 6 – Résultats de la sensibilité du test de mesure de l'expression de *hTERT*. Exp : expérience, # : numéro, ND : non détecté.

Proportion de cellules (%)		Amplification <i>hTERT</i> (Cp)												
BMM-SCs	MG-63	RÉPLICAT	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10	Exp 11	
		#												
		1	33,65	34,67	33,72	34,75	34,13	34,70	35,00	35,30	33,93	33,95	34,41	
	2,50	2	33,58	35,00	34,98	34,77	34,29	34,35	34,08	34,63	33,66	34,17	33,70	
		3	33,39	34,57	34,71	33,80	34,16	34,02	34,53	35,40	33,88	33,71	34,26	
		1	35,03	35,42	36,04	35,26	35,67	35,99	35,52	36,04	34,54	34,97	35,24	
	1,00	2	34,11	35,87	35,12	35,17	35,56	35,50	34,59	35,99	35,17	35,11	35,17	
		3	34,53	35,89	34,58	34,73	35,78	35,57	34,78	35,92	34,66	35,59	34,86	
		1	35,67	35,30	35,03	35,32	36,53	36,33	35,34	37,05	35,81	35,94	35,46	
	0,75	2	34,52	36,97	35,73	35,84	35,51	36,72	36,90	36,31	34,21	35,91	36,81	
3		35,01	35,83	35,78	35,77	36,54	35,59	35,07	ND	34,82	35,84	34,94		
1		36,37	36,06	36,94	36,76	36,63	36,44	35,73	36,08	35,95	35,29	35,64		
0,50	2	34,96	35,26	35,89	36,30	35,87	36,27	36,87	36,27	36,06	37,91	35,80		
	3	34,94	36,26	36,56	36,48	37,12	36,28	36,87	36,20	35,58	36,76	35,79		
	1	36,21	36,06	36,93	37,39	ND	35,98	ND	ND	37,75	36,15	37,04		
0,25	2	36,33	36,08	36,84	36,23	36,76	35,85	36,86	ND	ND	36,68	35,99		
	3	36,58	36,15	36,78	37,48	35,60	36,26	ND	37,02	ND	37,93	36,32		

IV.A.4.3. Précision

La précision d'une procédure analytique représente le degré d'écartement entre une série de mesures obtenues à partir de différentes analyses d'un même échantillon, sous les mêmes conditions. La précision peut être considérée à 2 niveaux : la répétabilité, qui exprime la précision au sein d'une même expérience (*intra-run*), et la précision intermédiaire, qui exprime la précision entre différentes expériences, réalisés à des moments différents et/ou par différents opérateurs (*inter-run*) (ICH Guidelines 2005 ; U.S. Department of Health and Human Services et al. 2013 ; European Medicines Agency 2011).

L'analyse de la précision est réalisée grâce à une mesure standardisée de la déviation standard : le coefficient de variation (déviation standard/moyenne) (CV) (Reed et al. 2002). Pour le développement et la validation d'une méthode de type PCR, les bonnes pratiques de validation recommandent de fixer une limite acceptable de précision à 2% pour la précision *intra-run* et à 3% pour la précision *inter-run* (MPI Research 2015).

- *Répétabilité*

Pour plusieurs proportions de MG-63 *spikées* (de 20% à 0,25%), la répétabilité du test a été évaluée au sein d'une même expérience, en analysant l'expression de *hTERT* et de *PPIA* pour 6 triplicats. Dans ce cas, l'unique spécification en ce qui concerne la validation de la répétabilité est : le différentiel moyen entre l'expression de *hTERT* et de *PPIA* ($\Delta C_{p(hTERT-PPIA)}$ moyen) est caractérisé par un coefficient de variation inférieur à 2%.

Ce critère étant rempli pour les proportions de MG-63 allant de 20 à 0,5% (Tableau 7), la répétabilité est validée pour cet intervalle.

Tableau 7 – Résultats de la répétabilité du test de mesure de l'expression de *hTERT*. Tripl : triplicat, Moy : moyenne, * : triplicat invalidé. Les valeurs en gras sont inférieures au CV acceptable fixé à 2% pour les réactions de PCR (*intra-run*).

PROPORTION CELLULAIRE		$\Delta C_P(hTERT-PPIA)$										
BMMSCs	MG-63	Tripl 1	Tripl 2	Tripl 3	Tripl 4	Tripl 5	Tripl 6	Moy	SD	CV		
80,00		8,52	8,29	8,25	8,37	8,30	8,22	8,32	0,11	1,32%		
90,00	10,00	9,25	9,13	9,29	9,06	9,24	9,13	9,18	0,09	0,98%		
95,00	5,00	9,73	9,96	9,88	9,85	10,11	10,13	9,94	0,16	1,61%		
97,50	2,50	11,22	11,28	10,95	11,15	11,08	11,32	11,17	0,14	1,25%		
99,00	1,00	12,33	12,28*	12,08	12,31	12,26	11,91	12,18	0,18	1,48%		
99,25	0,75	12,52	12,44	12,56	12,75	12,61	12,62	12,58	0,11	0,87%		
99,50	0,50	12,73	13,32	13,23	13,17	13,09	13,13	13,11	0,20	1,52%		
99,75	0,25	12,87	13,36	13,50	13,14	12,92	13,69	13,25	0,33	2,49%		

- *Précision intermédiaire*

Pour plusieurs proportions de MG-63 *spikées* (de 20% à 0,25%), la précision intermédiaire du test a été évaluée sur 6 expériences indépendantes, au sein desquelles l'expression de *hTERT* et de *PPIA* ont été analysées en triplicats. Comme pour la répétabilité, l'unique spécification en ce qui concerne la validation de la précision intermédiaire est : le $\Delta C_{p(hTERT-PPIA)}$ moyen est caractérisé par un coefficient de variation inférieur à 3%.

Ce critère est rempli pour l'ensemble des proportions de MG-63 testées, sauf pour l'échantillon contenant 0,25% de MG-63 (Tableau 8).

Tableau 8 – Résultats de la précision intermédiaire du test de mesure de l'expression de *hTERT*. Exp : expérience, Moy : moyenne. Les valeurs en gras sont inférieures au CV acceptable fixé à 3% pour les réactions de PCR (*inter-run*). Il est à noter que l'expérience 2 correspond au triplicat 1 utilisé pour l'analyse de la répétabilité.

PROPORTION CELLULAIRE		$\Delta C_{P(hTERT-PPIA)}$								
BMMSCs	MG-63	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Moy	SD	CV
80,00	20,00	8,57	8,52	8,72	8,38	8,58	8,23	8,50	0,17	2%
90,00	10,00	9,39	9,25	9,65	9,22	9,40	9,04	9,33	0,21	2,25%
95,00	5,00	9,91	9,73	10,18	10,23	9,93	9,88	9,98	0,19	1,90%
97,50	2,50	11,11	11,22	11,48	11,36	11,09	11,02	11,21	0,18	1,61%
99,00	1,00	12,22	12,33	12,24	12,18	11,98	11,62	12,10	0,26	2,14%
99,25	0,75	12,64	12,52	12,97	12,39	12,50	12,38	12,57	0,22	1,75%
99,50	0,50	13,02	12,73	12,61	13,28	13,26	12,62	12,92	0,31	2,45%
99,75	0,25	13,99	12,87	13,30	14,93	13,70	13,20	13,67	0,73	5,34%

En mettant l'analyse de la répétabilité et de la précision intermédiaire en perspective, on peut définir un intervalle au sein duquel la précision est acceptable. Cet intervalle est appelé le *range* (ICH Guidelines 2005 ; U.S. Department of Health and Human Services et al. 2013 ; European Medicines Agency 2011). Les coefficients de variation inférieurs à la limite fixée par les bonnes pratiques de validation sont compris entre 20% et 0,5% de MG-63. La limite de détection est contenue dans cet intervalle.

IV.A.4.4. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité, au sein d'un intervalle défini, de générer des résultats directement proportionnels à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon (European Medicines Agency 2011 ; ICH Guidelines 1995). Pour être validée, la linéarité doit répondre au critère suivant : la régression linéaire calculée sur base des valeurs de $\Delta C_{p(hTERT-PPIA)}$ doit être caractérisée par un coefficient de détermination (R^2) supérieur à 0,95 sur au minimum 3 mesures expérimentales successives obtenues à partir de différentes proportions de MG-63 *spikées*.

La Figure 11 montre que ce critère d'acceptation est respecté, puisque le coefficient de détermination de la régression linéaire est de 0,9643 et est donc supérieur à la limite acceptable.

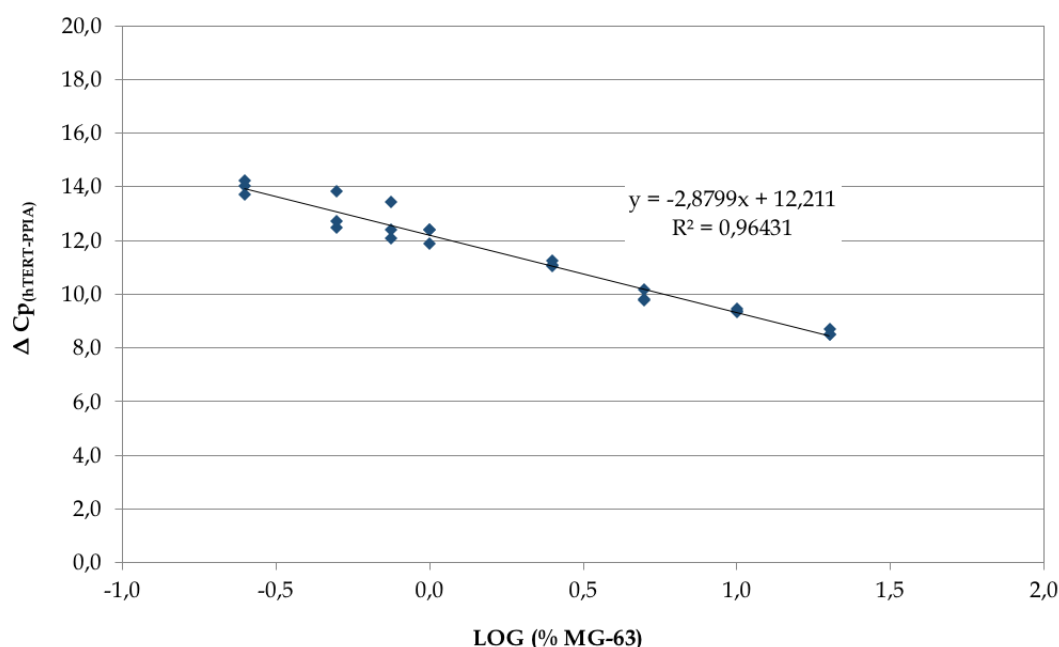


FIGURE 11 – Résultats de l'analyse de linéarité de la mesure de l'expression de *hTERT*.

IV.A.5 Discussion

La validation du test « Mesure de l'expression de *hTERT* » a consisté en l'analyse de 5 paramètres, résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9 – Résumé de la validation du test « Mesure de l'expression de *hTERT* ».

PARAMÈTRE	RÉSULTAT	STATUT
Spécificité	BMMSCs (100%) : ND MG-63 (100%) : $C_p = 29,13 \pm 0,02$ MG-63 (5%) : $C_p = 32,36 \pm 0,14$	Validé
Sensibilité	1% MG-63	Validé
Répétabilité	De 20% à 0,25% MG-63 : $CV < 5\%$	Validé
Précision intermédiaire	De 20% à 0,5% MG-63 : $CV < 5\%$	Validé
Linéarité	$R^2 = 0,9643$	Validé

Puisque tous les critères d'acceptation sont respectés (et notamment, la spécificité et la sensibilité), la méthode est validée en test limite avec une limite de détection de 1% de MG-63. Sur base d'une analyse statistique, nous pouvons définir que cela correspond à un $\Delta C_p_{(hTERT-PPIA)}$ de 12,62 cycles (distribution unilatérale ; $\alpha = 0,05$), sur base du calcul suivant :

$$\begin{aligned}\Delta C_p_{(hTERT-PPIA)} &= \Delta C_p_{(hTERT-PPIA)} \text{moyen} + (t\alpha \times SD \Delta C_p_{(hTERT-PPIA)}) \\ &= 12,10 + (2,015 \times 0,26) = 12,62 \text{ cycles}\end{aligned}$$

où

$\Delta C_p_{(hTERT-PPIA)}$: expression moyenne normalisée de *hTERT* pour l'échantillon correspondant à 1% de MG-63 *spikées* ;

$SD \Delta C_p_{(hTERT-PPIA)}$: déviation standard de l'expression moyenne normalisée de *hTERT* pour l'échantillon correspondant à 1% de MG-63 *spikées* ;

$t\alpha$: probabilité de rejet d' α (0,05) et intervalle de confiance de $1-\alpha$ (0,95), avec une taille de population de 6.

Ainsi, pour qu'un échantillon soit considéré comme négatif pour l'expression de la télomérase avec un intervalle de confiance de 95%, deux cas de figures sont possibles :

- Aucune expression n'est détectée ;
- Un niveau d'expression est détecté. Dans ce cas, le $\Delta C_p_{(hTERT-PPIA)}$ doit être inférieur à la valeur seuil de 12,62 cycles.

V Développement de méthodes analytiques

V.A Mesure de l'activité de la télomérase reverse transcriptase (*hTERT*)

V.A.1 Principe

En complément de la mesure de l'expression du gène codant pour la télomérase, il est utile de vérifier que sa protéine est active. En effet, il se peut que le gène *hTERT* soit exprimé mais que l'enzyme télomérase soit inactive. Dans ce cas, elle ne pourra pas effectuer sa fonction d'allongement des télomères. Le test « Mesure de l'activité de la télomérase » est basé sur une combinaison des techniques de PCR et d'ELISA (*Enzyme-Like ImmunoSorbent Assay*), résumées dans la Figure 12. Il se déroule en trois grandes étapes (Roche Life Science n.d.) :

- La première étape est une élongation plus ou moins importante d'une séquence télomérique par la télomérase endogène, en fonction de son niveau d'activité et de sa quantité ;
- La seconde étape consiste en une PCR, qui est utilisée pour amplifier le produit d'élongation ;
- Finalement, la longueur de la séquence amplifiée est quantifiée par ELISA.

Ce test est entièrement basé sur l'utilisation d'un kit commercialisé par Roche (#11854666910).

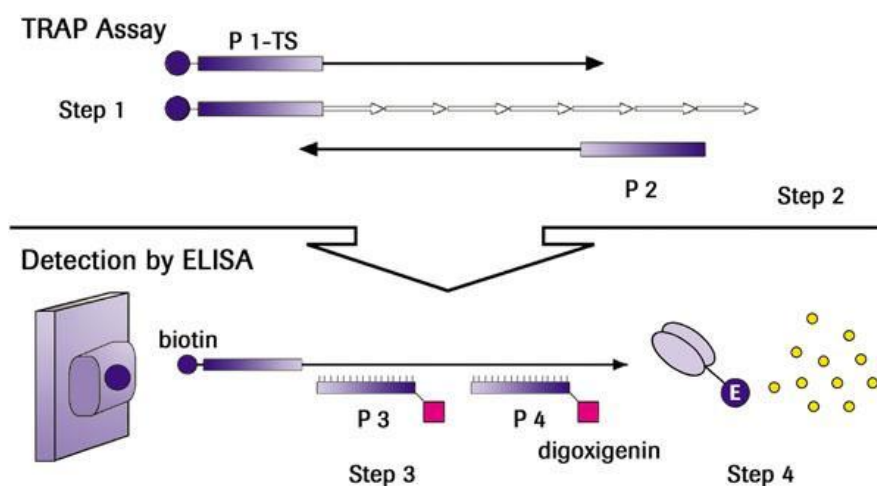


FIGURE 12 – Fonctionnement du test « Mesure de l'activité de la télomérase », tel que décrit dans le kit « TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA » de Roche (Roche Life Science n.d.).

V.A.2 Matériel et méthodes

V.A.2.1. Contrôles

Deux types de contrôles sont pris en compte dans le test « Mesure de l'activité de la télomérase » :

- Le contrôle positif est fourni dans le kit « TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA » (Roche, #11854666910). Il s'agit d'un extrait protéique lyophilisé, obtenu à partir de cellules rénales immortalisées et exprimant la télomérase (cellules 293). Cet extrait resuspendu dans 20 μ L d'eau *PCR grade* est utilisé à raison de 3 μ L par réaction ;
- Les contrôles négatifs sont l'eau *PCR grade* et la solution de lyse utilisée dans l'extraction protéique.

V.A.2.2. Echantillons cellulaires et *spiking*

Dans ce test, les cellules souches mésenchymateuses naïves (BMMSCs) ont été utilisées en guise d'échantillon négatif, car elles n'expriment pas la télomérase (Zimmermann et al. 2003) (ceci a été confirmé grâce à l'utilisation du test validé « Mesure de l'expression de *hTERT* »). Les échantillons positifs, quant à eux, sont représentés par quatre lignées tumorales :

- MG-63, lignée issue d'un ostéosarcome humain (Pautke et al. 2004) ;
- HT1080, cellules tumorales issues d'un fibrosarcome humain (ATCC 2014b) ;
- A549, cellules d'un adénocarcinome des cellules alvéolaires humaines (ATCC 2014a) ;
- U937, cellules d'un lymphome histiocytique humain (Harris & Ralph 1985).

Le test « Mesure de l'expression de *hTERT* » a permis de confirmer que ces lignées tumorales expriment le gène codant pour la télomérase, ce qui est cohérent avec la littérature (Yu et al. 2014 ; Hiyama et al. 2001).

Pour développer le test « Mesure de l'activité de la télomérase », des échantillons cellulaires contenant différentes proportions de ces cellules tumorales ont été préparés par *spiking*, dont le principe a été présenté dans la section relative au test précédent. Les cellules négatives utilisées pour le *spiking* sont les BMMSCs.

V.A.2.3. Extraction de protéines

Après décongélation, des échantillons contenant 200 000 cellules sont centrifugés à 400 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les culots obtenus sont ensuite mis

à sec en éliminant le surnageant.

En utilisant cette quantité cellulaire fixe, l'extraction de protéines est réalisée avec une partie du kit « TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA », en suivant exactement les instructions du fournisseur (Roche Life Science n.d.). Ainsi, 175 μ L de protéines sont récoltées après extraction.

Si les extraits protéiques ne sont pas utilisés immédiatement, ils sont stockés à une température inférieure à -60°C.

V.A.2.4. Quantification des protéines

Une fois extraites, les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford. Une courbe standard est réalisée grâce à une série de concentrations connues de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Biorad, #500-0207). Cinq microlitres d'échantillon sont ajoutés à 250 μ L de réactif de Bradford (Biorad, #500-0205). Après incubation pendant 5 minutes à température ambiante, l'absorbance est finalement lue au SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices) à 595 nm. La concentration en protéines totales dans l'échantillon est alors calculée sur base de l'équation de la courbe standard de la BSA.

V.A.2.5. Méthodes moléculaires

Pour réaliser le test, le kit « TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA » est à nouveau utilisé. Trois étapes se succèdent dans ce test : élongation, PCR et ELISA.

- *Manipulation n°1 : élongation*

En fonction de son niveau d'activité, la télomérase (contenue dans l'extrait protéique obtenu à partir d'un échantillon cellulaire) ajoute plus ou moins de répétitions télomériques à l'extrémité 3' d'une amorce biotinylée (Figure 12 : P1-TS). Pour cela, l'extrait protéique est mis en présence du mélange de réaction fourni dans le kit (qui contient notamment l'amorce P1-TS constituée de répétitions télomériques et destinées à l'allongement). L'ensemble est maintenu à 25°C pendant 30 minutes (Tableau 10).

- *Manipulation n°2 : PCR*

La PCR est ensuite destinée à amplifier le produit d'élongation de la télomérase. Pour cela, 3 μ L d'échantillon protéique sont placés dans chaque puits d'une plaque 96-puits, avec 25 μ L de mélange de réaction, qui contient les amorces P1-TS et P2 dont les séquences sont gardées secrètes par le fournisseur. L'eau *PCR grade* est utilisée

pour compléter le volume à 50 μ L. Les échantillons sont analysés en simplipats. L'amplification est réalisée selon le programme de cycles thermiques présenté au Tableau 10.

Tableau 10 – Programme de cycles thermiques pour les 2 premières étapes du test « Mesure de l'activité de la télomérase » (élongation et PCR). N/A : non applicable.

PROGRAMME	NOMBRE DE CYCLES	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (HH:MM:SS)
Elongation	1	25	00 :30:00
Inactivation de la télomérase	1	94	00:05:00
Amplification	30	94	00:00:30
		50	00:00:30
		72	00:01:30
N/A	1	72	00:10:00

- *Manipulation n°3 : ELISA*

Finalement, la longueur de la séquence amplifiée est quantifiée par ELISA. Pour cela, le produit PCR est d'abord dénaturé. Une sonde spécifique au bloc répétitif télomérique et couplée à la digoxigénine (DIG) (Figure 12 : P3, P4) peut alors s'y fixer, le taux de fixation de cette sonde étant proportionnel à l'élongation de la séquence P1-TS. Le produit d'hybridation est ensuite immobilisé sur une plaque *coatée* à la streptavidine, grâce à l'interaction biotine/streptavidine. Une fois immobilisé, celui-ci est détecté par un anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase. La quantification est finalement visualisée par l'action de la peroxydase, qui métabolise le TMB (tétra-méthyl benzidine) et le transforme en TMDI, un produit coloré absorbant la lumière à 450 nm (Roche Life Science n.d. ; Garg et al. 2015).

Pour cette étape, les indications du fournisseur (Roche Life Science n.d.) sont suivies, à une exception près : l'agitation des plaques se fait à 50 rpm (et non à 300 rpm). Les échantillons sont analysés en duplicats.

Finalement, l'absorbance est lue au SpectraMax 190 MicroPlate Reader (*Molecular Devices*) à 450 nm et 690 nm. Cette deuxième longueur d'onde est utilisée pour corriger le signal du à des événements aspécifiques, tels que la précipitation des protéines, la présence de débris cellulaires ou encore des défauts dans la plaque de lecture (par exemple, des empreintes de doigts). Pour traiter les données, il suffit de soustraire la valeur d'absorbance obtenue à 690 nm à celle obtenue à 450 nm. On obtient alors le

$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$. Ce dernier est proportionnel à l'élongation de la séquence P1-TS et donc à l'activité de la télomérase endogène.

V.A.3 Développement et optimisation de la méthode

Lors du développement de ce test, il a été décidé d'en faire un test limite. Nous avons donc analysé sa spécificité, sensibilité et précision (même si ce dernier paramètre n'est pas requis pour le développement d'une méthode limite).

V.A.3.1. Spécificité

Pour déterminer si la méthode proposée par *Roche* est spécifique, trois types d'échantillons ont été analysés :

- Des cellules de la lignée tumorale HT1080, connues pour ses hauts niveaux d'expression et d'activité de la télomérase (Hiyama et al. 2001) ;
- Des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BMMSCs), utilisées en guise d'échantillon négatif ;
- Des HT1080 et BMMSCs dont les extraits protéiques ont été inactivés par dénaturation à 85°C pendant 10 minutes.

Comme présenté à la Figure 13 et en adéquation avec les résultats attendus, les HT1080 montrent une activité télomérase. De plus, la dénaturation protéique à 85°C élimine la quasi totalité du signal d'activité télomérase. Les BMMSCs, quant à elles, montrent un niveau d'activité télomérase significativement différent de celui des HT1080 et comparable au bruit de fond observé pour les contrôles négatifs du test (solution de lyse et eau *PCR grade*), ce qui, une fois de plus, correspond au résultat attendu. Afin de vérifier que la différence d'activité télomérase entre les HT1080 et les BMMSCs n'est pas due à une mauvaise extraction protéique, la concentration en protéines totales a été évaluée grâce à la méthode de Bradford (Tableau 11). Ce test a permis de déterminer que la quantité de protéines totales n'a pas d'influence directe sur la mesure de l'activité télomérase, puisque l'échantillon de BMMSCs testé montre 28,2 fois moins de signal d'activité télomérase que les HT1080, malgré qu'il contienne 2,52 fois plus de protéines.

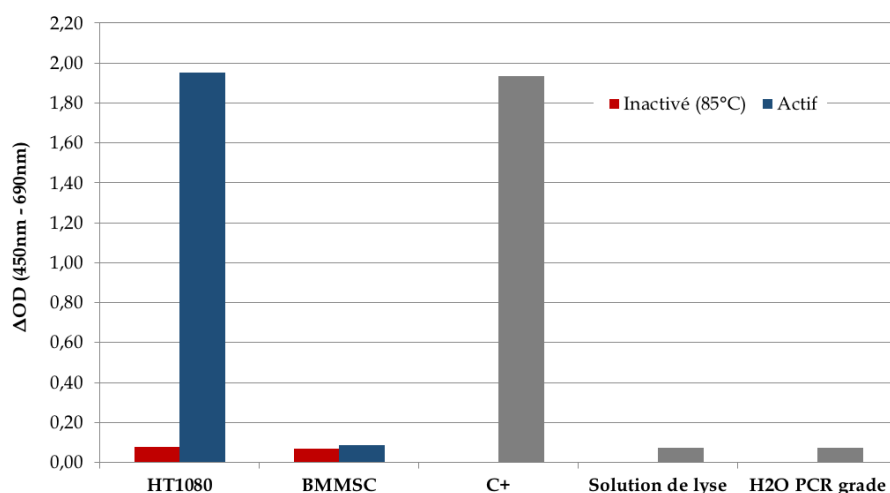


FIGURE 13 – Spécificité du test « Mesure de l'activité de la télomérase ».

Tableau 11 – Résultats du test de Bradford sur les échantillons HT1080 et BMMSC utilisés dans l'analyse du paramètre « sensibilité ».

ECHANTILLON	CONCENTRATION EN PROTÉINES TOTALES (mg/mL)
HT1080	0,50
BMMSC	1,26

Au vu des résultats obtenus à la Figure 13, nous pouvons affirmer que le test « Mesure de l'activité de la télomérase » est spécifique.

V.A.3.2. Sensibilité

Il existe plusieurs manières de calculer la LOD d'une méthode analytique, la plus classique consistant à appliquer un facteur 3 au contrôlé négatif. Dans le cas de ce test, le contrôle négatif choisi comme référence est l'eau *PCR grade*. En effet, ce choix nous permet de tenir compte du pire cas puisque l'on ne tient pas compte des éventuelles influences de la solution de lyse sur le signal d'activité télomérase.

Pour le calcul de la sensibilité, des échantillons *spikés* contenant de 5% à 0,025% de HT1080 ont été analysés dans 6 expériences.

Le Tableau 12 présente le résultat obtenu pour les échantillons contenant 0,1% et 0,25% de HT1080. En termes de HT1080, la sensibilité du test est de 0,25% étant donné que l'ensemble des valeurs obtenues pour cette proportion sont trois fois supérieures au blanc. Cela signifie que, lorsque l'échantillon contient 0,25% de cellules HT1080, le $\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ est au minimum par 3 fois supérieur au bruit de fond.

Tableau 12 – Sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase », en termes de HT1080. # :
numéro. Les valeurs en gras sont celles 3 fois supérieures au blanc.

Expérience #	H ₂ O PCR grade	$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ moyen	
		0,100% HT1080	0,250% HT1080
1	0,0872	0,2419	0,6429
		0,3671	0,6392
		0,4929	0,6488
		0,2785	0,3284
		0,2186	0,7965
2	0,1254	0,4104	0,7603
		0,3958	0,7534
		0,3823	0,7656
		0,3940	0,7421
		0,3931	0,7083
3	0,1186	0,3140	0,9657
	0,3292	0,7586	1,2369
4	0,1021	0,2571	0,8830
	0,5163	1,0836	1,5626
5	0,1099	0,2640	0,7562
	0,0734	0,5932	0,8940
6	0,1049	0,2490	0,7414
	0,1740	0,8274	1,1445

Afin de rendre compte du fait que le niveau d'activité télomérase peut varier au sein de types cancéreux différents, la sensibilité du test a également été analysée en utilisant trois autres lignées tumorales (Tableau 13) :

- MG-63. Cette lignée semble avoir le même niveau d'activité que les HT1080, puisque la sensibilité du test en termes de MG-63 est également de 0,25% ;
- A549. En utilisant cette lignée, la sensibilité du test est inférieure à 0,1%, ce qui témoigne d'un niveau d'activité télomérase plus élevé que dans les HT1080 et MG-63 ;
- U937. Contrairement aux A549, le niveau d'activité télomérase des cellules de la lignée U937 est plus faible que les HT1080 (sensibilité de 1%).

Tableau 13 – Sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase », en termes de MG-63, A549 et U937. Les valeurs en gras sont celles 3 fois supérieures au blanc.

Proportion de cellules tumorales (%)	$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ moyen		
	A549	U937	MG-63
5,000	2,4103	1,4393	2,0895
2,500	2,4638	1,0451	1,9171
1,000	2,3432	0,5620	1,3649
0,500	2,4782	0,3021	0,5492
0,250	2,4559	0,2400	0,5131
0,100	1,8313	0,4199	0,1733
H ₂ O PCR grade		0,10735	

La sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase » a été comparée à celle du test validé « Mesure de l'expression de *hTERT* », en utilisant les quatre lignées tumorales décrites précédemment. Ainsi, le Tableau 14 montre que la mesure de l'activité de la télomérase est une méthode en moyenne 4,4 fois plus sensible que la mesure de l'expression du gène codant pour cette enzyme.

Tableau 14 – Comparaison de la sensibilité des tests « Mesure de l'expression de *hTERT* » et « Mesure de l'activité de la télomérase ».

SENSIBILITÉ			
Lignée tumorale	Expression <i>hTERT</i>	Activité <i>hTERT</i>	Facteur expression <i>vs</i> activité
HT1080	0,25%	0,25%	1x
A549	0,25%	< 0,1%	2,5x
MG-63	1%	0,25%	4x
U937	10%	1%	10x

V.A.3.3. Précision

Pour le développement et la validation d'une méthode impliquant des interactions de type récepteur-ligand (« *ligand binding assays* »), l'ICH a défini une limite acceptable de précision, qui correspond à un CV de 20% (European Medicines Agency 2011 ; ICH Guidelines 1995). De plus, comme évoqué précédemment, pour les réactions de PCR, cette limite est fixée à 2% pour la précision *intra-run* et 3% pour la précision *inter-run* (MPI Research 2015).

L'analyse de la précision a ici été faite séparément pour chacune des deux étapes du test (PCR et ELISA), en utilisant des proportions de cellules HT1080 *spikées* allant de 5% à 0,025%. Le Tableau 15 présente les coefficients de variation obtenus pour chaque analyse de précision réalisée. Les résultats détaillés sont présentés à l'Annexe 3. Ces résultats montrent que la PCR est caractérisée par des CV largement supérieurs à 2% (seule la solution de lyse a un CV inférieur à cette limite). L'ELISA, quant à lui, est caractérisé par des CV majoritairement inférieurs à la limite de 20% (la seule valeur qui l'excède correspond à 0,025% de HT1080 et a un CV de 23,3%). Ainsi, nous pouvons déduire que c'est l'étape de PCR qui crée le plus de variabilité au sein du test. De plus, la précision diminue avec le pourcentage de cellules tumorales. Autrement dit, moins l'échantillon *spiké* contient de cellules HT1080, plus le coefficient de variation est élevé.

Tableau 15 – Résultats de la précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (2% pour la précision *intra-run* de la PCR, 3% pour l'*inter-run* de la PCR et 20% pour l'ELISA).

Echantillon	Proportion (%)	COEFFICIENT DE VARIATION			
		PCR <i>inter-run</i>	ELISA <i>inter-run</i>	ELISA <i>intra-run</i>	<i>Intra-run</i> global
HT1080	5,000	4,3%	2,9%	15,3%	15,4%
	2,500	3,6%	4,3%	16,1%	12,8%
	1,000	6,3%	3,0%	15,3%	17,8%
	0,500	11,1%	3,7%	16,7%	15,0%
	0,250	21,4%	3,1%	15,9%	26,5%
	0,100	24,1%	2,5%	10,8%	34,7%
	0,050	29,3%	3,6%	15,2%	34,7%
	0,025	31,8%	3,0%	23,3%	72,3%
	0,000	37,0%	2,2%	6,5%	26,5%
C+	N/A	7,0%	1,6%	15,7%	19,5%
Solution de lyse	N/A	0,5%	4,3%	7,2%	18,7%
H ₂ O PCR grade	N/A	26,1%	1,4%	11,0%	56,3%

La précision intermédiaire du test dans sa globalité a également été analysée. Pour cela, le test a été réalisé 5 fois, de manière indépendante (5 réactions PCR indépendantes, suivies de 5 ELISA indépendants). Ceci nous permet de déterminer le *range* du test, c'est-à-dire l'intervalle de *spiking* pour lequel la précision est acceptable. Comme le Tableau 15 le montre, les CV inférieurs à 20% sont situés entre 5% et 0,5% de HT1080.

V.A.4 Discussion

Pour mesurer l'activité de la télomérase, un test limite se basant sur un kit commercial de Roche (« TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA ») et utilisant successivement deux méthodes (PCR et ELISA), a été développé.

Ainsi, le développement du test a tout d'abord permis de déterminer que cette méthode est spécifique. En effet, les cellules tumorales testées montrent une forte activité télomérase et les BMMSCs montrent une activité assimilable au bruit de fond. Ceci correspond au résultat attendu.

En ce qui concerne la sensibilité, celle-ci a d'abord été calculée par référence aux cellules HT1080. En utilisant ce type tumoral, elle a été fixée à 0,25% (ce qui correspond à 500 cellules HT1080, le fond total étant de 200 000 cellules). L'analyse de la précision intermédiaire globale du test a mis en évidence un intervalle de *spiking* à l'intérieur duquel celle-ci est acceptable (*range*) : de 5% à 0,5% de cellules HT1080. Ainsi, pour que la limite de détection soit associée à une certaine rigueur dans la précision du test, elle peut être corrigée et donc fixée à 0,5% de cellules HT1080. Bien que la sensibilité ait également été définie avec les cellules tumorales MG-63 (0,25%), d'A549 (< 0,1%) et d'U937 (1%), la précision du test n'a pas été analysée avec ces trois lignées et leur *range* n'a donc pas été déterminé. Les trois valeurs de sensibilité énoncées ci-dessus sont donc des valeurs non corrigées en fonction de la précision.

En regroupant les limites de détection obtenues pour les quatre lignées tumorales testées, on observe que la sensibilité du test « Mesure de l'activité de la télomérase » est en moyenne 42,5 fois plus élevée que celle du caryotype (qui, pour rappel, est de 10%).

L'analyse de la précision a montré que l'étape de PCR crée plus de variations que l'étape d'ELISA au sein du test. Cependant, cette observation peut être biaisée par le fait que, pour évaluer la précision de la PCR, cette dernière doit être obligatoirement suivie par un ELISA, qui est la seule source de résultat chiffré. Dans ce cas, les variations créées par l'ELISA s'ajoute à la variabilité de la réaction PCR. Par contre, lorsque la précision de l'étape ELISA est analysée, la variabilité due à la PCR est éliminée puisque le test est réalisé à partir d'un seul produit d'amplification. L'accumulation des variabilités de

ces deux méthodes pourrait donc expliquer pourquoi l'évaluation de la précision de l'étape PCR montre des CV plus élevés. Ce raisonnement peut également être appliqué à la précision globale du test. Les deux méthodes sont en effet prises en compte dans cette analyse, et leurs variabilités peuvent donc s'accumuler, expliquant pourquoi la moitié des coefficients de variation sont supérieurs au seuil acceptable de 20%.

Bien que la précision ne soit pas un élément essentiel du développement d'un test limite, nous pouvons tout de même envisager de l'améliorer. L'origine du problème de précision étant l'utilisation successive de deux méthodes, il pourrait être judicieux d'en faire un test possédant une seule étape. L'étape de PCR ne peut pas être supprimée. Elle est en effet indispensable au test puisqu'elle transforme la séquence simple brin P1-TS (séquence télomérique allongée par la télomérase endogène) en séquence double brin. La quantification de la longueur de P1-TS peut, quant à elle, être faite grâce à une autre technique que l'ELISA. Les étapes d'amplification et de mesure de la longueur de la séquence télomérique pourraient être combinées en une seule étape de qPCR. Plusieurs études ont été menées pour créer un test de qPCR destiné à la mesure de la longueur des télomères *in vitro* (O'Callaghan et al. 2008 ; Cawthon 2009 ; Cawthon 2002 ; Gil & Coetzer 2004 ; F. Wang et al. 2013 ; Criscuolo et al. 2009 ; Callicott & Womack 2006), et l'une d'entre elles est d'ailleurs comprise dans ce mémoire (ceci sera discuté dans la section V.C, sur le test « Mesure de la longueur des télomères »). L'utilisation de la qPCR dans le cadre du test « Mesure de l'activité de la télomérase » nécessite de tenir compte de deux principes :

- Cela implique de recourir à un agent fluorescent, qui peut soit être une sonde soit un agent intercalant. Une sonde complémentaire à la séquence télomérique ne serait ici pas judicieuse. En effet, les télomères étant composés de blocs répétitifs identiques, la fixation de la sonde serait aléatoire et non représentative. Il faudrait donc utiliser un agent intercalant, comme le SYBR Green.
- Selon les directives de la pharmacopée européenne, pour pouvoir être utilisé en tant que test de diagnostic *in vitro*, ce test de qPCR devrait contenir un contrôle interne (Broeders et al. 2014). Cela signifie qu'un gène de référence, dont les caractéristiques d'amplification sont connues et invariables, doit être amplifié dans le même puits que la séquence télomérique (qPCR *multiplex*). Ceci pose problème, pour deux raisons principales. Tout d'abord, parce que nous travaillons à partir d'une séquence « artificielle » contenant uniquement des répétitions télomériques. Aucun gène n'est contenu dans cette séquence et ne peut donc être amplifié. Nous pouvons contrer ce problème en remplaçant la séquence P1-TS par de l'ADN génomique (que l'on dénature, pour obtenir de l'ADN simple-brin et ainsi permettre l'action de la télomérase). Le second problème réside dans l'utilisation du SYBR Green, qui rend l'amplification en *multiplex* plus complexe. En effet,

lorsque l'on travaille avec un agent intercalant, on ne peut utiliser qu'un seul type de signal fluorescent (qPCR monochromatique), ce qui rend la co-amplification de plusieurs gènes complexe. La mise en place de ce système est néanmoins possible en retardant l'acquisition du signal d'amplification du gène de référence (Cawthon 2009). Cette méthode fera l'objet d'une description plus détaillée dans la section V.C.

Quant à savoir si la qPCR est une méthode aussi fiable que l'ELISA pour quantifier la longueur d'une séquence télomérique, cela est discutable. Alors que la mesure de la longueur des télomères par qPCR est une méthode récente et en cours d'amélioration, certaines études s'interrogent en effet sur sa reproductibilité et sa sensibilité (Gutierrez-Rodrigues et al. 2014 ; Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012).

En résumé, alors que la création d'un test en une étape (qPCR) permettrait théoriquement d'augmenter la précision du test, elle demanderait des étapes supplémentaires de développement. De plus, la fiabilité de mesure de la longueur des télomères par qPCR est remise en cause par certains articles. Pour ces raisons, l'utilisation de l'ELISA dans le test « Mesure de l'activité de la télomérase » semble pour l'instant être la meilleure option de quantification.

Le développement du test étant clôturé, la validation devra encore être réalisée. Celle-ci consistera en l'évaluation des mêmes paramètres mais avec des critères prédéfinis et permettra de s'assurer que de la fiabilité et reproductibilité du test (Organisation Mondiale de la Santé 1998).

V.B Détection de mutations corrélées au phénotype ALT

V.B.1 Principe

Comme précédemment évoqué, certaines cellules tumorales n'utilisent pas hTERT pour allonger leurs télomères, mais un mécanisme alternatif. Les cellules utilisant le mécanisme ALT possèdent un phénotype particulier (Henson et al. 2002 ; Cesare & Reddel 2010 ; Henson & Reddel 2010). Tous les tests permettant l'identification de cellules ALT-positives se basent sur l'identification de deux caractéristiques : la présence d'APBs (par immuno-colocalisation entre l'ADN télomérique et la protéine PML) et la présence d'ADN télomérique extra-chromosomique circulaire (Henson et al. 2009). Bien qu'à l'heure actuelle, aucun test ne s'attelle à l'analyse du génotype spécifique aux cellules ALT-positives, il existe des preuves solides que le phénotype ALT est associé à la présence de certaines mutations

V.B.1.1. Mutations corrélées au phénotype ALT

Il existe 4 gènes dont les mutations sont fortement corrélées au phénotype ALT :

- **TP53.** Le phénotype ALT est associé à une inactivation du gène *TP53*. Parmi les causes de cette inactivation, la présence de mutations causant la perte de fonction est prédominante (Henson & Reddel 2010 ; Mekeel et al. 1997 ; Chen et al. 2006 ; Mangerel 2015). Pour identifier plus précisément les mutations corrélées au mécanisme alternatif d'allongement des télomères, une recherche dans la base de données « IARC TP53 » (<http://p53.iarc.fr/>) a été effectuée en sélectionnant les cancers où la prévalence d'ALT est élevée (Tableau 16). Cette recherche a permis d'identifier trois codons parmi les plus fréquemment mutés dans les tumeurs ALT-positives : 175 (6,12%), 248 (7,15%) et 273 (14,23%) (Figure 15). Les mutations de ces trois codons (R175H, R248W, R248Q, R273H, R273C) ont donc été sélectionnées. Ceci nous permet d'analyser 27,5% des mutations présentes dans les cancers ALT.

Tableau 16 – Prévalence du mécanisme alternatif d’allongement des télomères dans 6 sous-types cancéreux (Christopher M. Heaphy et al. 2011 ; Henson & Reddel 2010).

Sous-type cancéreux	Prévalence d’ALT (%)
Chondrosarcome	100
Astrocytome anaplastique	63
Sarcome indifférencié	63
Ostéosarcome	59
Leiomyosarcome	55
Glioblastome	44

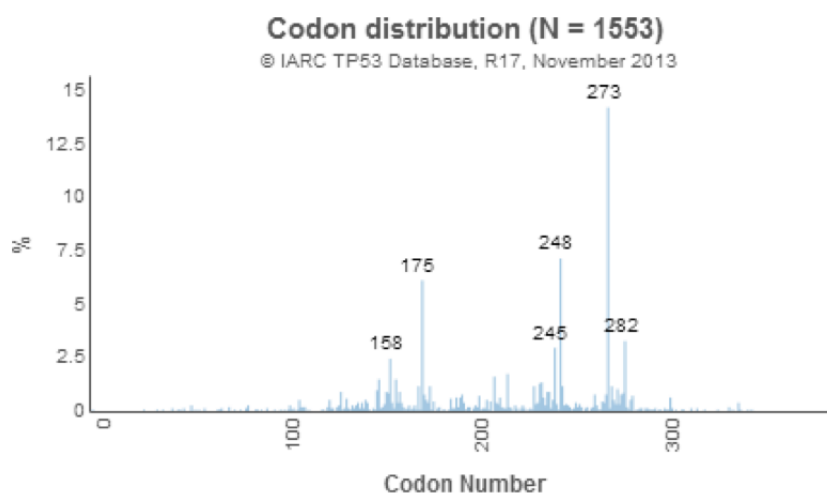


FIGURE 14 – Distribution des mutations de *TP53* dans les cancers ALT-positifs, telle qu’obtenue sur la base de données IARC TP53.

- *IDH1* (*Isocitrate Dehydrogenase 1*), gène codant pour une enzyme impliquée dans la respiration cellulaire. Une fois son gène muté, cette enzyme produit l’oncométabolite [R]-2-hydroxyglutarate ([R]-2HG) par métabolisation du 2-oxoglutarate (Mangerel 2015). La mutation d’*IDH1* pourrait être directement impliquée dans la promotion de la recombinaison homologue entre télomères, puisque le [R]-2HG inhibe notamment les méthylases des histones H3K9, H3K27 et H3K36 (Mangerel 2015 ; Horbinski 2013). Cela crée un schéma différent de remodelage de la chromatine (perte de l’hétérochromatine (Episkopou et al. 2014)), rendant l’activation du mécanisme ALT plus aisée (Sturm et al. 2012 ; Liu et al. 2012 ; Wiestler et al. 2013). Trois études ont été menées pour établir le lien entre les mutations d’*IDH1* et le phénotype ALT. Celles-ci ont permis de déterminer que la forme mutée d’*IDH1* est retrouvée en moyenne dans 79% des cellules ALT-positives

(Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013). Malheureusement, l'équivalence n'est pas encore connue. Autrement dit, aucune étude ne s'intéresse à connaître le pourcentage de cellules ALT-négatives pour lesquelles le gène *IDH1* est muté. De plus, la littérature ne mentionne qu'une seule mutation pour ce gène : R132H (Sturm et al. 2012 ; Liu et al. 2012 ; Wiestler et al. 2013 ; Jiao et al. 2012 ; Abedalthagafi et al. 2013 ; Nguyen et al. 2013).

- ***H3F3A***, le gène codant pour l'histone H3.3. Bien qu'aucune étude ne donne d'indications sur la proportion de cellules ALT-positives possédant une mutation dans le gène *H3F3A*, quatre d'entre elles affirment qu'il y a une forte corrélation entre la présence de la forme mutée de ce gène et l'activation du mécanisme ALT (Sturm et al. 2012 ; Liu et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012). Les trois mutations les plus fréquentes dans ce gène sont : K27M, G34R et G34V (Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012). Etant donné que l'histone H3.3 est impliqué dans le remodelage de la chromatine, une mutation dans le gène *H3F3A* provoque, comme pour *IDH1*, une perte de la structure hétérochromatique (permissive d'ALT) (Mangerel 2015).
- ***ATRX*** (*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*). Ce gène code pour une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine. Plus précisément, la protéine ATRX joue un rôle dans le maintien de l'intégrité hétérochromatique en chargeant l'histone H3.3 aux télomères (Mangerel 2015). Selon plusieurs recherches, une altération de cette protéine provoque l'activation du mécanisme ALT, et ce en moyenne dans 87,3% des cas (Jiao et al. 2012 ; Lovejoy et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012). De plus, dans 90,6% des cellules ALT-positives, le gène *ATRX* est muté (Kannan et al. 2012 ; Christopher M Heaphy et al. 2011 ; Lee et al. 2015). A ce jour, seule l'étude de Heaphy *et al* s'est intéressée à connaître le pourcentage de cellules ALT-négatives pour lesquelles la protéine ATRX est altérée. Cette étude révèle que 2% (1/50) des cellules ALT-négatives possèdent une forme altérée de la protéine ATRX. Les mutations d'*ATRX* sont majoritairement des délétions, avec deux « *hotspots* » correspondant au domaine ADD et au domaine ATPase/hélicase de la protéine (Maze et al. 2012 ; Kondo et al. 2014).

Bien que certaines de ces mutations soient exclusives (comme c'est le cas pour *IDH1* et *H3F3A* (Sturm et al. 2012 ; Schwartzentruber et al. 2012)), il apparaît que, dans la majorité des cas, les gènes discutés ci-dessus sont mutés simultanément. Ainsi, selon une étude, 86% des cellules ALT-positives possèdent une mutation dans *TP53*, *ATRX*, *IDH1* et/ou *H3F3A* (Schwartzentruber et al. 2012).

V.B.1.2. Méthode de détection des mutations de *TP53*, *IDH1* et *H3F3A*

Plusieurs méthodes existent pour la détection de mutations ponctuelles (Nollau & Wagener 1997). Parmi celles-ci, nous avons sélectionné la technique décrite par Morlan *et al*, pour sa haute sensibilité ainsi que sa facilité et rapidité d'exécution (Morlan *et al*. 2009). Il s'agit d'une technique basée sur le principe de l'ASB-PCR (*Allele-Specific PCR with a Blocking reagent*). La méthode utilise la combinaison de trois types d'amorces (Morlan *et al*. 2009) :

- une amorce sens complémentaire à la séquence mutée, dont l'extrémité 3' se termine par la base substituée d'intérêt ;
- une amorce sens bloquée en 3' par un groupement phosphate (PO₄), complémentaire à la séquence « *wild type* » (WT) ;
- une amorce anti-sens.

Suite à la combinaison de ces amorces au sein d'un même mélange PCR, deux cas de figures sont possibles (Figure 15) :

- Si la séquence de l'ADN échantillon est WT, l'amorce sens complémentaire à la séquence WT se fixera préférentiellement. Etant donné que l'extension d'une amorce nécessite la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en 3' (Atdbio n.d.), la présence d'un groupement phosphate à cet endroit de l'amorce sens bloque l'amplification (Morlan *et al*. 2009).
- Si la séquence de l'ADN échantillon est mutée, c'est l'amorce sens complémentaire à cette mutation ponctuelle qui sera préférentiellement fixée. Dans ce cas, la séquence mutée sera amplifiée (Morlan *et al*. 2009).

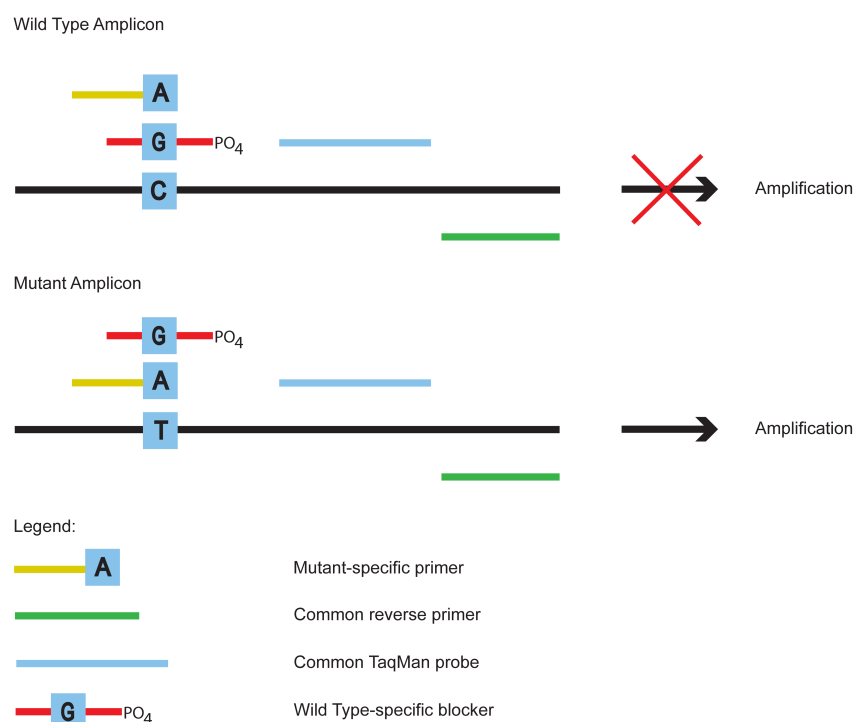


FIGURE 15 – Méthode ASB-PCR pour la détection des mutations ponctuelles (substitution), telle que décrite par Morlan *et al.* (Morlan *et al.* 2009).

V.B.2 Matériel et méthodes

Dans le cadre de ce mémoire, le développement du test a été partiellement réalisé pour la détection des mutations R273C et R273H du gène *TP53*. Les méthodes décrites ci-dessous correspondent au protocole initial du test. Son développement mènera à des modifications des détails de ces méthodes, qui seront discutées dans la section suivante.

V.B.2.1. Contrôles

Trois contrôles sont utilisés dans le test « Détection des mutations ALT » :

- L'échantillon servant de contrôle négatif est classiquement l'eau *PCR grade* ;
- Un autre contrôle négatif, spécifique à chaque gène muté, est incarné par un plasmide codant pour la séquence WT du gène *TP53* (appelé « plasmide *TP53* WT »). Il permet de contrôler que le système n'amplifie pas la séquence WT ;
- Le contrôle positif est aussi un plasmide, codant cette fois pour la séquence propre à chaque mutation. Le plasmide contenant la mutation R273H de *TP53* est nommé « plasmide *TP53* R273H », tandis que le plasmide codant pour la séquence mutée R273C de *TP53* est nommé « plasmide *TP53* R273C ».

Les références des plasmides utilisés dans ce mémoire sont indiquées dans le Tableau 17.

Tableau 17 – Plasmides utilisés comme contrôles du test « Détection des mutations ALT ».

PLASMIDE	FOURNISSEUR	RÉFÉRENCE
TP53 WT, (Myc-DDK-tagged)-Human tumor protein 53 (TP53), transcript variant 1	<i>Origene</i>	#RC200003
TP53 R273H, TP53 mutant (R273H), Myc-DDK-tagged ORF clone of <i>Homo sapiens</i> tumor protein 53 (TP53), transcript variant 1	<i>Origene</i>	#RC400073
TP53 R273C, TP53 mutant (R273C), Myc-DDK-tagged ORF clone of <i>Homo sapiens</i> tumor protein 53 (TP53), transcript variant 1	<i>Origene</i>	#RC400072

V.B.2.2. Extraction d'ADN génomique

Après décongélation, des échantillons contenant 1 000 000 cellules (quantité déterminée sur base de l'optimisation de l'extraction d'ADN réalisée dans le test « Mesure de la longueur des télomères ») sont centrifugés à 400 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les culots obtenus sont mis à sec par élimination du surnageant.

A partir de cette quantité cellulaire fixe, l'extraction d'ADN génomique est réalisée grâce au kit « QIAamp DNA Mini Kit » (*Qiagen*, #51304). La procédure décrite par le fournisseur (QIAGEN n.d.) est suivie, en tenant compte de l'étape facultative d'ajout de RNase A (*Qiagen*, #19101) (étape également déterminée par le développement du test « Mesure de la longueur des télomères »).

Si les échantillons d'ADN génomique extrait ne sont pas utilisés immédiatement, ils sont stockés à des températures inférieures à -15°C.

V.B.2.3. Quantification d'ADN génomique

Une fois extrait, l'ADN génomique est quantifié au spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (*ThermoScientific*), dont la mesure d'absorbance peut être convertie en concentration d'ADN génomique selon la formule suivante (Research Gate n.d.) :

$$1 \text{ unité OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Le rapport des absorbances mesurées à 260 nm et à 280 nm est utilisé pour évaluer

la pureté de l'ADN extrait et doit être proche de 1,8 (Research Gate n.d.). Le tampon AE, utilisé pour l'élution de l'ADN génomique lors de son extraction, sert de blanc.

V.B.2.4. Réactions de qPCR

- *Préparation des contrôles externes*

Chacun des deux plasmides contrôles sont conditionnés dans de l'eau *PCR grade* pour obtenir une solution stock de 100 ng/ μ L. Les plasmides sont alors dilués de façon sériée dans une solution de Poly A (12,5 ng/ μ L) (*Life Technologies*, #POLYA.GF), pour atteindre des concentrations allant de 250 pg/ μ L à 0,25 fg/ μ L.

- *Préparation des amorces et des sondes fluorescentes*

Deux jeux différents d'amorces/sonde ont été dessinés et analysés pour le développement du test « Détection des mutations ALT » pour le criblage des mutations R273H et R273C du gène *TP53*. Leurs séquences sont présentées dans le Tableau 18. Elles ont été conçues chez *Celyad* et fabriquées par la firme *IDT*. Chaque amorce sens WT bloquante est diluée dans de l'eau *PCR grade* pour atteindre une concentration de 36 μ M. Les amorces sens pour la mutation et anti-sens sont diluées dans de l'eau *PCR grade* pour atteindre une concentration de 9 μ M. La sonde fluorescente (FAM) est reconstituée dans un volume adapté de Tris-EDTA (*Sigma-Aldrich*, #93283) pour obtenir une solution stock à 100 μ M, par la suite diluée à 2 μ M.

Tableau 18 – Amorces et sondes utilisées dans le test « Détection des mutations ALT ». Les séquences sont notées de 5' en 3'. # : numéro.

MUTATION	JEU	AMORCE SENS (MUTATION)	AMORCE SENS (WT)	AMORCE ANTI-SENS	SONDE
TP53 R273H	#1	CAGCTTT- GAGGTGCA	TTTGAGG- TGCGTG- TTTGTG-PO ₄	TGGTGT- TGTTGG- GCAGTG	FAM- CACAGAGG- AAGAGAA- TCTCCG- CAAGAAAG- BHQ TM 1
	#2	CAGCTTT- GAGGTGCA	CTTTG- AGGTGC- GTGTTTG- TGCC-PO ₄	GCTGG- TGTTGTTG- GGCAGTG	FAM-CCGGCGC- ACAGAGGAAG- AGAATCT- CCGCA- AGAAAG- GGGAG -BHQ TM 1
TP53 R273C	#1	GAA- CAGCTTT- GAGGTGT	TTTG- AGGTGCG- TGTTTGTG- PO ₄	TGGTGT- TGTTGG- GCAGTG	FAM- CACAGAGG- AAGAGA- ATCTCC- GCAAGAAAG- BHQ TM 1
	#2	GAA- CAGCTTT- GAGGTGT	CTTTGA- GGTGCG- TGTTTGTGCC- PO ₄	GCTGGTG- TTGTTGG- GCAGTG	FAM-CCGGCGC- ACAGAGGAAG- AGAATCT- CCGCAA- GAAAG-GGGAG -BHQ TM 1

- *Préparation du mix de la réaction de qPCR*

Pour la préparation du mélange de la réaction, le kit « LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes » (Roche, #04991885001) est utilisé. Le « Master mix » de ce kit contient l'ADN Polymérase Tth, le tampon de réaction ainsi qu'un mélange de dNTPs (où les dTTPs ont été remplacés par des dUTPs). L'activateur permet d'ajuster la concentration de Mn(OAc)₂. Seize microlitres du mélange présenté au Tableau 19 sont ajoutés à chaque puits d'une plaque 96-puits.

Tableau 19 – Composition du mélange de réaction qPCR pour le test « Détection des mutations ALT ».

RÉACTIF	QUANTITÉ (μL)	RÉFÉRENCE
Amorce sens (WT)	1	IDT
Amorce sens (mut)	1	IDT
Amorce anti-sens	1	IDT
Sonde (FAM)	1	IDT
Activateur	1,3	Roche, #04991885001
Master mix	7,4	Roche, #04991885001
H2O PCR grade	3,3	Roche, #04991885001

- *Préparation des échantillons*

L'ADN extrait et quantifié selon la procédure décrite précédemment est dilué pour atteindre une concentration de 50 ng/μL. Quatre microlitres de cette dilution sont ajoutés aux puits correspondant dans la plaque 96-puits. Chaque échantillon est analysé en triplicat.

- *Programme de qPCR*

Une fois le mix et les échantillons disposés dans la plaque, celle-ci est placée dans le LightCycler® 480 II (Roche) et le programme de cycles thermiques présenté au Tableau 4 est lancé ; il s'agit du même programme que pour le test « Mesure de l'expression de *hTERT* ».

V.B.2.5. Méthodes mathématiques

- *Conversion de la quantité de plasmide en nombre de copies*

Pour connaître le nombre de copies correspondant à une certaine quantité analysée de plasmide, la formule suivante a été utilisée :

$$\left(\frac{A \text{ ng} \times 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ molécule/mole}}{B \times \frac{650 \text{ g}}{\text{mole}} \times 10^9 \text{ ng/g}} \right) / 2$$

où,

A est la quantité de plasmide

B est la longueur de la séquence d'intérêt du plasmide

V.B.3 Développement et optimisation de la méthode

V.B.3.1. Approche

Comme mentionné dans la section V.B.2, les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire pour le développement du test « Détection des mutations ALT » concernent le criblage des mutations R273H et R273C du gène *TP53*.

Cette méthode a fait l'objet d'une optimisation en ce qui concerne l'amplification de la séquence mutée. En effet, nous avons créé deux jeux d'amorces/sonde, chaque jeu différant par les températures d'hybridation (T_m) des amorces et de la sonde qui les constituent. Dans l'article qui décrit sa méthode, Morlan *et al* mentionne qu'il s'agit d'un facteur clé de la réaction de qPCR. Plus encore, afin de maximiser l'efficacité de la méthode, il a rédigé des lignes conductrices pour le dessin des amorces et de la sonde. Les températures d'hybridation des amorces et de la sonde de chaque jeu sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20 – Températures d'hybridation des amorces et sonde de chaque jeu, pour l'optimisation du test « Détection des mutations ALT ». Les températures d'hybridation ont été calculées via l'outil « OligoAnalyzer 3.1 » mis à disposition par la firme IDT.

MUTATION	JEU	AMORCES/SONDE	T_m (°C)
TP53 R273H	#1	Amorce sens mutée	49,1
		Amorce sens WT	53,9
		Amorce anti-sens	56
		Sonde	60,3
	#2	Amorce sens mutée	49,1
		Amorce sens WT	59,6
		Amorce anti-sens	59,6
		Sonde	70,4
TP53 R273C	#1	Amorce sens mutée	49,5
		Amorce sens WT	53,9
		Amorce anti-sens	56
		Sonde	60,3
	#2	Amorce sens mutée	49,5
		Amorce sens WT	59,6
		Amorce anti-sens	59,6
		Sonde	70,4

Comme pour les autres méthodes dont le développement ou la validation ont fait l'objet de ce mémoire, le test de détection des mutations ponctuelles corrélées au phénotype ALT a été développé en tant que test limite. Sa spécificité et sa sensibilité doivent donc être déterminées.

V.B.3.2. Spécificité

Pour l'évaluation de la spécificité des deux jeux d'amorces/sonde pour le criblage des mutations R273H et R273C du gène *TP53*, une expérience utilisant différents mélanges de réaction a été réalisée :

- un mélange contenant l'amorce sens respectivement complémentaire à chaque séquence mutée du gène de *TP53*, ainsi que l'amorce anti-sens (Tableaux 21-22, colonne n°1) ;
- un mélange contenant l'amorce sens complémentaire à la séquence WT de *TP53*, dont l'extrémité 3' est bloquée par un groupement phosphate, et l'amorce anti-sens (Tableaux 21-22, colonne n°2). Pour l'ensemble des jeux d'amorces/sonde, la théorie et la pratique coïncident, puisqu'aucun produit n'est amplifié suite à l'utilisation de ce mélange de réaction ;
- un mélange contenant l'amorce sens complémentaire à la séquence WT de *TP53*, non bloquée en 3', et l'amorce anti-sens (Tableaux 21-22, colonne n°3). Pour chaque mutation et chaque jeu d'amorces/sonde correspondant, l'utilisation de ce mélange de réaction provoque l'amplification constante d'un produit, correspondant à la séquence du gène *TP53* WT ;
- le mélange complet de réaction décrit par Morlan *et al.* Chaque mélange, associé à chaque mutation, contient l'amorce sens mutée, l'amorce sens WT bloquée ainsi que l'amorce anti-sens (Tableaux 21-22, colonne n°4).

La spécificité de chaque jeu d'amorces/sonde est évaluée par le calcul du différentiel $\Delta C_{p_{(WT-M)}}$, un indice qui représente la différence de C_p entre l'amplification du plasmide *TP53* WT et des plasmides *TP53* R273H ou R273C. Cet indice témoigne du degré d'amplification de la séquence mutée par rapport à la séquence de *TP53* WT.

En ce qui concerne la mutation R273H, les résultats obtenus au Tableau 21 nous indiquent que le deuxième jeu d'amorces/sonde est plus spécifique que le premier. En effet, alors que le premier jeu provoque une amplification de la séquence du plasmide *TP53* WT lorsque le mélange complet est utilisé (colonne n°4), cet échantillon n'est pas détecté avec le deuxième jeu. De plus, l'utilisation de l'amorce sens mutée (colonne n°1) seule révèle un différentiel $\Delta C_{p_{(WT-M)}}$ plus élevé pour le deuxième jeu d'amorces/sonde ($\Delta C_{p_{(WT-M)}} = 7,81$) que pour le premier jeu ($\Delta C_{p_{(WT-M)}} = 3,20$). Ceci témoigne d'une amplification préférentielle de la séquence mutée plus importante pour le deuxième jeu. La tendance observée pour le criblage de la mutation R273H est similaire pour celui de la mutation R273C (Tableau 22). En effet, que ce soit pour le mélange complet (colonne n°4) ou pour le mélange contenant uniquement l'amorce sens mutée (colonne n°1), la valeur du $\Delta C_{p_{(WT-M)}}$ est plus importante lorsque le deuxième jeu d'amorces/sonde est

utilisé.

Les résultats observés à la première colonne des Tableaux 21 et 22 permettent de se rendre compte que le système de fonctionnement de l'amorce sens mutée n'est pas optimal, puisque son utilisation permet également d'amplifier le plasmide *TP53* WT, dans une moindre mesure. En effet, comme nous l'avons évoqué dans la section V.B.1.2, le dessin de cette amorce est particulier : en 3', elle se termine par la base substituée dans la mutation de *TP53* (G est remplacée par A pour la mutation R273H et C est remplacée T pour la mutation R273C). Théoriquement, la fixation de cette amorce sur la séquence WT est possible, mais cela ne devrait pas résulter en une amplification puisqu'il y aurait alors un mésappariement entre la séquence de *TP53* WT et l'extrémité 3' de l'amorce mutée. Selon Morlan *et al*, celui-ci est suffisant pour empêcher l'amplification de la séquence WT par l'amorce sens mutée. Dans la pratique, l'efficacité de ce mésappariement pour inhiber l'amplification est à nuancer, étant donné la présence d'un signal pour le plasmide *TP53* WT quand l'amorce sens mutée est utilisée seule.

Pour expliquer la différence de spécificité observée entre les jeux d'amorces/sonde, nous pouvons évoquer les différences de T_m entre ceux-ci (Tableau 20). Pour chaque mutation, l'amorce sens complémentaire à la séquence mutée ne change pas. Par contre, les dessins de l'amorce sens complémentaire à la séquence WT, de l'amorce anti-sens, ainsi que de la sonde fluorescente sont différents entre le premier et le deuxième jeu. Ceci résulte en l'obtention d'une T_m plus haute pour le deuxième jeu. La spécificité du test « Détection des mutations ALT » sera principalement influencée par la température de dissociation de l'amorce sens complémentaire à la séquence WT, puisque le principe de fonctionnement du système d'amplification décrit par Morlan *et al* repose entre autres sur cette dernière. Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse que, si la T_m de cette amorce est plus élevée, elle pourra mieux se fixer à la séquence WT de *TP53*. L'équilibre compétitif pour la fixation à la séquence WT entre l'amorce sens mutée et l'amorce sens WT sera alors déplacé en faveur de la fixation de l'amorce sens WT, et le blocage de l'amplification du plasmide *TP53* WT sera donc plus efficace. Par ailleurs, augmenter la T_m de l'amorce sens WT provoque également un recul du C_p lié à l'amplification du plasmide *TP53* R273H/C, étant donné qu'une quantité plus importante de cette amorce peut se fixer sur la séquence mutée et donc bloquer son amplification.

Pour justifier que, lorsque le mélange avec l'amorce sens mutée seule est utilisé, le C_p de l'amplification des plasmides *TP53* R273H/C est plus faible d'environ 2 cycles pour le jeu n°2 que pour le jeu n°1, le raisonnement concernant l'augmentation de la T_m peut être appliqué à la sonde fluorescente, dont le dessin est identique pour les deux mutations. En effet, augmenter la T_m de la sonde permettrait d'augmenter sa fixation

et donc de diminuer le Cp lié à l'amplification de la séquence mutée.

Finalement, nous observons que le criblage de la mutation R273C est de manière générale moins spécifique que celui de la mutation R273H. Ceci s'observe principalement via le mélange contenant uniquement l'amorce sens mutée, qui montre un différentiel $\Delta C_{p_{(WT-M)}}$ plus faible pour la mutation R273C ($\Delta C_{p_{(WT-M)}} = 1,15$ pour le deuxième jeu d'amorces/sonde) que pour la mutation R273H ($\Delta C_{p_{(WT-M)}} = 7,81$ pour le deuxième jeu d'amorces/sonde). Ceci traduit une plus forte amplification de la séquence du plasmide *TP53* WT. Ce phénomène semblant indépendant du dessin des amorces et de la sonde – la tendance est identique pour les deux jeux de la mutation R273C – l'explication est à chercher ailleurs. Ainsi, une explication possible réside dans la stabilité des mésappariements entre la séquence *TP53* WT et l'amorce sens mutée. En effet, il se peut que le mésappariement T:C (mutation R273C) soit plus stable que le mésappariement A:G (mutation R273H). Ainsi, l'amplification de la séquence WT de *TP53* serait favorisée pour le criblage de la mutation R273C par une plus forte stabilisation de la fixation de l'amorce sens mutée sur le plasmide *TP53* WT.

Tableau 21 – Résultats de l'analyse de spécificité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273H de TP53.

	ECHANTILLON	Amorce sens mutée				Amorce sens WT+PO ₄				Amorce sens WT-PO ₄				Amorce sens mutée & amorce sens WT+PO ₄			
		C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD
J _{EU} R273H	Plasmide TP53 WT	26,68	0,30	ND	ND	ND	ND	23,75	0,09	30,85	0,69						
	Plasmide TP53 R273H	23,48	0,19	ND	ND	ND	ND	22,62	0,08	23,12	0,04						
	ADN génomique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22,84	0,06	34,55	0,37						
	H ₂ O PCR grade	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND						
#2	Plasmide TP53 WT	28,59	0,10	ND	ND	ND	ND	22,38	0,13	ND	ND						
	Plasmide TP53 R273H	20,78	0,12	ND	ND	ND	ND	21,65	0,02	27,39	0,16						
	ADN génomique	27,94	0,13	ND	ND	ND	ND	22,59	0,03	ND	ND						
	H ₂ O PCR grade	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND						

Tableau 22 – Résultats de l'analyse de spécificité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273C de TP53.

JEU R273C	ECHANTILLON	Amorce sens mutée		Amorce sens WT+PO ₄		Amorce sens WT-PO ₄		Amorce sens mutée & amorce sens WT+PO ₄	
		Cp	SD	Cp	SD	Cp	SD	Cp	SD
#1	Plasmide TP53 WT	23,74	0,04	ND	ND	23,75	0,09	27,03	0,05
	Plasmide TP53 R273C	22,90	0,06	ND	ND	22,89	0,11	22,33	0,15
	ADN génomique	23,72	0,38	ND	ND	22,84	0,06	24,94	0,05
	H ₂ O PCR <i>grade</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
#2	Plasmide TP53 WT	22,14	0,04	ND	ND	22,38	0,13	32,75	0,10
	Plasmide TP53 R273C	20,99	0,02	ND	ND	22,24	0,10	25,10	0,11
	ADN génomique	22,74	0,09	ND	ND	22,59	0,03	34,39	0,56
	H ₂ O PCR <i>grade</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

V.B.3.3. Sensibilité

Tout comme l'analyse de la spécificité, la sensibilité a été analysée au cours d'une expérience unique. Pour cela, les plasmides *TP53* R273H et *TP53* R273C ont été dilués en série, avec un facteur 10 entre chaque dilution. Les quantités de plasmides ont ensuite été transposées en nombre de copies de plasmides, afin de déterminer la quantité minimale de copies mutées que le test peut détecter (LOD). Les résultats sont présentés au Tableau 23 et au Tableau 24.

Pour définir la limite de détection du test, nous comparons le *C_p* obtenu suite à l'amplification de chacune de ces quantités de plasmides mutés avec le résultat obtenu pour l'amplification d'une quantité arbitraire de plasmide *TP53* WT (1 pg). Ce dernier échantillon correspond au nombre maximal de copies WT de *TP53* qui peuvent être retrouvées au sein d'un échantillon d'ADN extrait, si l'on considère un protocole théorique où 1 pg d'ADN serait analysé dans chaque puits. La LOD est déterminée comme la plus petite quantité de plasmide muté pour lequel le *C_p* est directement inférieur au *C_p* obtenu pour le plasmide *TP53* WT à 1 pg.

Théoriquement, la sensibilité du test devrait être influencée par sa spécificité. En effet, comme nous l'avons vu dans la section précédente, la spécificité du test peut être diminuée suite à l'amplification de la séquence WT de *TP53* par l'amorce sens mutée. Ceci est applicable pour le jeu d'amorces/sonde n°1 de chaque mutation, pour lequel l'amplification non-voulue de *TP53* WT est causée par un manque de fixation de l'amorce sens WT censée bloquer l'amplification cette séquence (car sa *T_m* est trop basse), mais également pour la détection de la mutation R273C de manière générale, pour laquelle l'amplification non-désirée de *TP53* WT est causée par une stabilisation du mésappariement entre l'amorce sens mutée et la séquence WT de *TP53*. Etant donné que le plasmide *TP53* WT représente la référence à laquelle on compare les résultats des différentes quantités de plasmides mutés, une augmentation de signal pour celui-ci provoquera forcément une augmentation de la LOD.

En pratique, nous avons observé que, pour le criblage de la mutation R273H comme de la mutation R273C, le jeu d'amorces/sonde utilisé n'a pas d'impact sur la sensibilité du test. Cependant, la LOD est plus élevée dans le cadre de la détection de la mutation R273C. Pour la détection de la mutation R273H, la limite de détection du test équivaut à 1% de copies mutées. Le criblage de la mutation R273C est moins sensible, puisque sa limite de détection est ici évaluée à 10% de copies mutées. Cependant, nous pouvons plutôt dire qu'elle est située entre 10 et 1%, étant donné que la valeur du *C_p* obtenue pour 0,01 pg de plasmide *TP53* R273C (1%) est juste au-dessus du *C_p* obtenu pour le plasmide *TP53* WT et qu'il y a environ 3 cycles d'écart entre le *C_p* observé pour 0,1 pg

de plasmide *TP53* R273C (10%) et le Cp du plasmide *TP53* WT.

Ces résultats semblent donc indiquer que la modification des températures d'hybridation des amorces et de la sonde n'a pas d'impact visible sur le calcul de la LOD. Par contre, la stabilisation du mésappariement T:C dans le cadre de l'amplification de la séquence WT de *TP53* avec l'amorce sens mutée R273C a une influence plus importante sur la sensibilité du test.

Tableau 23 – Résultats de l'analyse de sensibilité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273H de *TP53*.

				Amplification		
JEU R273C	ECHANTILLON	QUANTITÉ (pg)	NOMBRE DE COPIES	Cp	SD	
#1	Plasmide TP53 R273H	1 000	3,92×10 ⁸	10,79	0,19	
		100	3,92×10 ⁷	14,18	0,20	
		10	3,9×10 ⁶	17,25	0,09	
		1	3,92×10 ⁵	20,89	0,04	
		0,1	3,92×10 ⁴	24,15	0,16	
		0,01	3,92×10 ³	27,74	0,19	
		0,001	3,92×10 ²	30,95	0,38	
		Plasmide TP53 WT	1	3,92×10 ⁵	30,85	0,09
	#2	Plasmide TP53 R273H	1 000	3,92×10 ⁸	16,17	0,11
			100	3,92×10 ⁷	20,22	0,17
10			3,92×10 ⁶	23,60	0,12	
1			3,92×10 ⁵	27,18	0,09	
0,1			3,92×10 ⁴	30,69	0,11	
0,01			3,92×10 ³	33,84	0,35	
0,001			3,92×10 ²	ND	ND	
Plasmide TP53 WT		1	3,92×10 ⁵	ND	ND	

Tableau 24 – Résultats de l'analyse de sensibilité des deux jeux d'amorces/sonde pour la détection de la mutation R273C de *TP53*.

				Amplification		
JEU R273H	ECHANTILLON	QUANTITÉ (pg)	NOMBRE DE COPIES	CP	SD	
#1	Plasmide TP53 R273C	1 000	3,92×10 ⁸	10,92	0,04	
		100	3,92×10 ⁷	14,29	0,16	
		10	3,9×10 ⁶	10,53	0,09	
		1	3,92×10 ⁵	20,96	0,24	
		0,1	3,92×10 ⁴	24,23	0,10	
		0,01	3,92×10 ³	27,83	0,12	
		0,001	3,92×10 ²	30,62	0,18	
	Plasmide TP53 WT	1	3,92×10 ⁵	27,03	0,05	
	#2	Plasmide TP53 R273C	1 000	3,92×10 ⁸	13,69	0,33
			100	3,92×10 ⁷	18,17	0,08
10			3,92×10 ⁶	22,10	0,13	
1			3,92×10 ⁵	26,00	0,09	
0,1			3,92×10 ⁴	29,42	0,10	
0,01			3,92×10 ³	32,82	0,08	
0,001			3,92×10 ²	ND	ND	
Plasmide TP53 WT		1	3,92×10 ⁵	32,75	0,10	

V.B.4 Discussion

Au cours de ce mémoire, la spécificité et la sensibilité de la méthode de « Détection des mutations ALT » ont été évaluées en comparant deux jeux d'amorces/sonde pour les mutations R273H et R273C du gène *TP53*.

Une première observation prise en compte lors de l'évaluation de la spécificité est l'efficacité de chaque amorce sens. Il apparaît que l'amorce sens WT est très efficace pour bloquer l'amplification de la séquence à laquelle elle s'hybride. En effet, lorsqu'elle est utilisée seule (Tableaux 21, 22 ; colonne n°2), aucun signal d'amplification par qPCR n'est détecté. Cela peut cependant poser problème si cette amorce se fixe à la séquence mutée, phénomène probablement récurrent étant donné que celle-ci ne possède qu'un seul mésappariement avec la séquence mutée de *TP53*. L'efficacité de l'amorce sens mutée, quant à elle, est à nuancer. En effet, alors qu'elle est censée permettre uniquement l'amplification de la séquence mutée correspondante de *TP53*, elle amplifie en partie la séquence WT du gène. Ceci est probablement dû au fait que la présence d'un seul mésappariement à l'extrémité 3' de l'amorce n'est pas suffisante pour empêcher l'initiation de l'amplification. Pour pallier ce problème, nous pourrions dessiner à nouveau l'amorce sens mutée dans le but qu'elle contienne plusieurs mésappariements (par exemple, 3) à son extrémité 3'. Cependant, si cette modification pourrait diminuer l'am-

plification de la séquence WT de *TP53* par l'amorce sens mutée, elle pourrait également diminuer l'amplification de la séquence mutée de *TP53* à cause de la présence de 2 mésappariements juste avant la base substituée au sein de l'amorce sens mutée. Pour cette raison, nous avons opté pour une autre solution, décrite par Morlan *et al* dans l'article décrivant sa méthode : l'amorce sens WT a été mise en excès (3 600 nM) par rapport à l'amorce sens mutée (900 nM). Ceci permet de diminuer le taux d'hybridation de l'amorce sens mutée sur la séquence WT de *TP53*. Cependant, la présence de l'amorce sens WT en plus grande quantité implique qu'elle se fixera de manière plus fréquente sur la séquence mutée et bloquera donc l'amplification d'une partie des copies mutées du gène *TP53*. Quoiqu'il en soit, modifier le rapport de ces concentrations reviendrait à accentuer l'amplification de la séquence *TP53* WT par l'amorce sens mutée. Il s'agit de trouver un compromis entre le problème de blocage d'amplification de la séquence mutée de *TP53* par l'amorce sens WT et le problème d'amplification de la séquence WT de *TP53* par l'amorce sens mutée.

Les résultats obtenus pour la spécificité du criblage des mutations R273H/C de *TP53* sont cohérents avec les résultats obtenus par Morlan *et al* dans l'article qui décrit la méthode, à savoir que le différentiel $\Delta C_p_{(WT-M)}$ est plus important lorsque la température de dissociation de certaines amorces et de la sonde est plus élevée. Selon les résultats observés aux Tableaux 21 et 22, nous avons conclu que cela était principalement le fruit de l'augmentation de T_m de l'amorce sens WT et de la sonde. En effet, une température de dissociation plus élevée de l'amorce sens WT peut provoquer une augmentation d'hybridation de celle-ci. Cela peut déplacer l'équilibre de fixation de cette amorce par rapport à l'amorce sens mutée sur la séquence WT de *TP53* et donc diminuer l'amplification cette séquence. Par le même principe d'augmentation de fixation, augmenter la T_m de la sonde fluorescente revient à favoriser l'amplification liée à l'amorce sens mutée, préférentiellement de la séquence mutée de *TP53*.

Finalement, pour l'analyse de spécificité, nous avons également remarqué que la détection de la mutation R273H est plus spécifique que la détection de la mutation R273C, probablement grâce à une plus grande stabilité du mésappariement entre la séquence WT et l'amorce sens mutée pour R273C (T:C), donc associée à une augmentation de l'amplification de la séquence WT par cette amorce. Morlan *et al* a observé que l'utilisation d'un mésappariement T:C réduisait le différentiel $\Delta C_p_{(WT-M)}$ par rapport à l'utilisation d'un mésappariement A:G, ce qui est en faveur de notre hypothèse. Pour appuyer cette théorie, nous pouvons analyser la spécificité de la détection d'autres mutations pour lesquelles le mésappariement amorce sens mutée:séquence WT est de type T:C et A:G. Pour déstabiliser la fixation de l'amorce sens mutée à la séquence WT de *TP53*, nous pourrions également opter pour la stratégie décrite ci-dessus, à savoir

re-dessiner les amorces afin d'y ajouter plusieurs mésappariements.

En ce qui concerne l'analyse de sensibilité de la méthode de « Détection des mutations ALT », celle-ci n'est pas influencée par le jeu d'amorces/sonde utilisé. Ceci reflète que la modification de T_m attribuée à chaque jeu n'a pas d'impact sur la détermination de la limite de détection du test. La sensibilité du criblage de la mutation R273H est, quant à elle, plus sensible (1% de copies de plasmide *TP53* R273H) que le criblage de la mutation R273C (entre 10 et 1% de copies de plasmide *TP53* R273C), ce qui implique une plus grande influence du phénomène de stabilisation du mésappariement amorce sens mutée : séquence WT dans le calcul de la LOD. Afin de déterminer de manière plus précise la limite de détection du test pour le criblage de la mutation R273C, il faudrait tester par qPCR des dilutions intermédiaires de plasmide *TP53* R273C.

Plusieurs expériences additionnelles peuvent être réalisées pour compléter l'évaluation de la sensibilité. Tout d'abord, il serait intéressant de tester plus de trois réplicats d'une même quantité de plasmides, mais également de répéter l'expérience plusieurs fois de manière indépendante. Ceci nous permettrait de tenir compte de la variabilité (répétabilité et précision intermédiaire) de la méthode pour calculer la LOD. Ensuite, afin d'analyser la sensibilité de la méthode dans un fond constant, nous pourrions *spiker* les plasmides *TP53* R273H/C dans le plasmide *TP53* WT. De plus, afin de déterminer la LOD non pas en termes de nombre de copies de plasmide muté mais en pourcentage de cellules tumorales ALT-positives, l'expérience devrait être reproduite en réalisant un *spiking* d'une ou plusieurs lignées tumorales ALT-positives. Cependant, le choix de la lignée à utiliser pour ce test est complexe, étant donné que toutes les lignées ALT-positives ne possèdent pas de mutations sur *TP53* ou un des autres gènes initialement visés par cette méthode. De plus, si c'est le cas, le nombre de copies mutées varie d'une lignée à l'autre. Bien que la méthode de détection des mutations ponctuelles par qPCR soit spécifique et présente une sensibilité intéressante, elle ne permet pas de cribler toutes les mutations des gènes *TP53*, *IDH1*, *H3F3A*. De plus, elle ne permet pas de détecter les mutations du gène *ATRX*, car il s'agit principalement de délétions dont la zone et l'étendue sont variables. Afin de rendre le test « Détection des mutations ALT » plus fiable, nous pourrions donc le remplacer par du séquençage de ces quatre gènes. Pour cela, le séquençage ciblé peut être utilisé : chaque gène est amplifié en utilisant deux amorces bordant ses extrémités, et la séquence de cette amplification est déterminée.

V.C Mesure de la longueur des télomères

V.C.1 Principe

Que ce soit via hTERT ou le mécanisme ALT, les cellules tumorales maintiennent la longueur de leurs télomères stable au cours des divisions. Dès lors, leur mesure constitue un aspect intéressant dans la détection des cellules tumorales. A l'heure actuelle, la mesure de longueur des télomères est principalement utilisée dans trois types d'études : celles destinées à faire le lien entre la sénescence répllicative et certains facteurs sociaux et environnementaux (Montpetit et al. 2014 ; Jodczyk et al. 2014 ; Heidinger et al. 2012), d'autres permettant l'étude des mécanismes sous-jacents du cancer (Wentzensen et al. 2011) et d'autres encore centrées sur le lien entre les télomères et certaines pathologies spécifiques (Willeit et al. 2010 ; Maubaret et al. 2010). Dans ce but, plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer la longueur des télomères :

- TRF (*Terminal Restriction Fragment*), méthode considérée comme standard. Dans ce test, l'ADN génomique est exposé à un mix d'enzymes de restriction dont aucune ne reconnaît les régions télomérique et subtélomérique. Les fragments télomériques intacts sont alors résolus sur un gel d'électrophorèse et visualisés par *Southern Blot* ou par hybridation d'une sonde spécifique radioactive. Le résultat est une traînée (« *smear* ») dont la taille et l'intensité sont comparées à une échelle de poids moléculaire pour déterminer la taille des fragments télomériques (Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012 ; Kimura et al. 2010 ; Vera & Blasco 2012).
- Q-FISH (*Quantitative Fluorescence In Situ Hybridisation*). Cette méthode, qui est pour l'instant la plus utilisée pour quantifier la longueur des télomères, est basée sur l'hybridation d'une sonde fluorescente (CCCTAA)₃, complémentaire aux répétitions télomériques. Contrairement aux autres méthodes, le matériel de base du Q-FISH sont des cellules. Pour l'analyse, celles-ci doivent être en interphase ou en métaphase. Récemment, une adaptation de la technique Q-FISH, appelée Flow-FISH, a été mise sur pied. Le Flow-FISH utilise la cytométrie de flux pour séparer des populations cellulaires en fonction de leur intensité fluorescente (liée à la fixation de la sonde (CCCTAA)₃ aux télomères), et fournit une longueur moyenne des télomères pour chaque population (Gutierrez-Rodriguez et al. 2014 ; Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012 ; Vera & Blasco 2012 ; Slijepcevic 2001).
- STELA (*Single Telomere Length Analysis*). Cette méthode permet l'analyse spécifique des télomères correspondant à chaque chromosome au sein d'une population cellulaire et s'oppose ainsi aux autres techniques, qui calculent plutôt la longueur moyenne. La méthode STELA est basée sur une PCR et consiste en l'amplification d'ADN télomérique grâce à des amorces spécifiques à la séquence subtélomérique (connue) d'un chromosome (Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012 ; Vera &

Blasco 2012 ; Jodczyk 2011).

Tableau 25 – Comparaison des avantages, des inconvénients et de la résolution des quatre types de méthodes existant pour mesurer la longueur des télomères *in vitro* (Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012 ; Vera & Blasco 2012 ; Jodczyk 2011).

MÉTHODE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	RÉSOLUTION
TRF	• Facilite les comparaisons entre investigateurs ; • Estimations de la longueur des télomères en kb.	• Evaluation de la longueur moyenne des télomères d'une population cellulaire ; • Très sensible à la dégradation de l'ADN ; • Surestimation de la vraie longueur télomérique ; • Ne détecte pas les télomères courts ; • Besoin de quantités élevées d'ADN (μg).	1 kb
Q-FISH	• Quantitatif ; • Reproductible ; • Exactitude élevée.	• Requiert une cellule mitotiquement active ; • Limité aux spécimens dont le taux de prolifération est faible ; • Long et complexe.	0,3 kb
STELA	• Evaluation de la longueur de chaque télomère individuellement ; • Ne requiert pas des quantités élevées de matériel cellulaire.	• Restreint aux extrémités chromosomiques dont la séquence est connue (XpYp, 2p, 11q, 17p) ; • Incapacité de mesure des télomères longs (> 8 kb) ; • Complexe ; • Dépendant de la quantité d'ADN testée.	0,1 kb
qPCR	• Simple ; • Rapide ; • Ne requiert pas des quantités élevées d'ADN (ng).	• Evaluation de la longueur moyenne des télomères d'une population cellulaire ; • Difficulté de comparaisons inter-études ; • Variabilité plus élevée que les autres méthodes.	ND

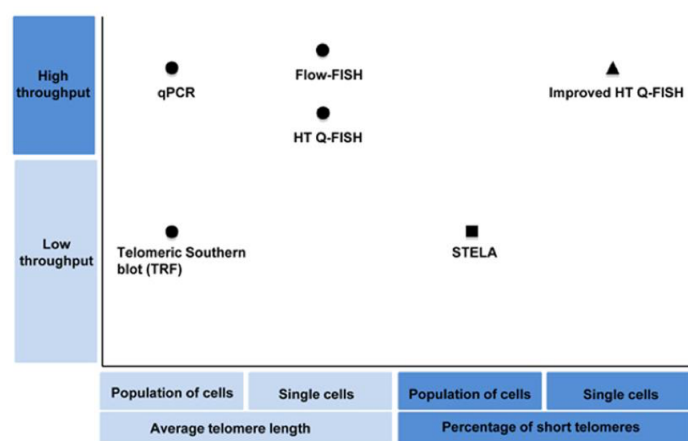


FIGURE 16 – Comparaison des méthodes existantes de mesure de la longueur des télomères *in vitro* (modifié à partir de (Vera & Blasco 2012)).

Au regard des avantages et inconvénients de chaque test (Tableau 25, Figure 16), la Q-FISH semble être la méthode la plus fiable pour l'évaluation *in vitro* de la longueur des télomères. Dans le cadre de ce mémoire, nous n'avons pourtant pas choisi cette technique. A la place, nous nous sommes tournés vers une quatrième méthode de mesure de la longueur des télomères : la qPCR (Montpetit et al. 2014 ; Aubert et al. 2012). Les raisons principales de ce choix sont la simplicité et la rapidité de cette méthode, éléments importants dans le cadre du développement d'un test de *release*. Richard M. Cawthon fut le premier à développer une telle technique (Cawthon 2009 ; Cawthon 2002). Alors que le test de Cawthon est construit pour les télomères humain, plusieurs scientifiques ont utilisé ses travaux pour adapter la méthode à d'autres organismes (O'Callaghan et al. 2008 ; Gil & Coetzer 2004).

Le développement du test « Mesure de la longueur des télomères » repose sur l'utilisation de la technique de qPCR *multiplex* monochromatique développée par Cawthon. *Multiplex*, parce qu'elle consiste à co-amplifier deux produits au sein d'une même réaction : les télomères et le gène de l'albumine, présent en une seule copie dans le génome. Pour rappel, la technique *multiplex* s'oppose au *singleplex*, où chaque produit est amplifié dans deux réactions différentes.

La subtilité de la méthode de Cawthon repose dans le fonctionnement de l'amplification du produit télomérique. Comme nous l'avons précédemment mentionné, les télomères humains sont constitués de séquences répétitives dont le bloc est TTAGGG. Plus le télomère contient de blocs répétitifs, plus il est long. Les amorces télomériques conçues par Cawthon (appelées *telg* et *telc*) génèrent un produit de longueur fixe, représentatif d'un assemblage de plusieurs de ces blocs. La fixation des amorces sera donc proportionnelle à la longueur du télomère, et l'amplification par qPCR permet

de quantifier les blocs répétitifs. L'amplification du produit télomérique se fait en deux étapes (Figure 17a) (Cawthon 2009) :

- Dans un premier temps, seule l'amorce *telg* est capable d'amorcer l'amplification du guide télomérique natif. L'amplification par *telc* est en effet bloquée par la présence d'un mésappariement entre le guide natif et l'extrémité 3' de l'amorce.
- La seconde étape consiste en l'hybridation de *telc* sur le produit d'extension de *telg* (obtenu à la première étape). Plusieurs configurations d'hybridation sont possibles, mais seule une permet l'amplification du bloc télomérique. Cela est possible grâce à la présence d'un chevauchement de 3 pb entre les extrémités 3' des deux amorces.

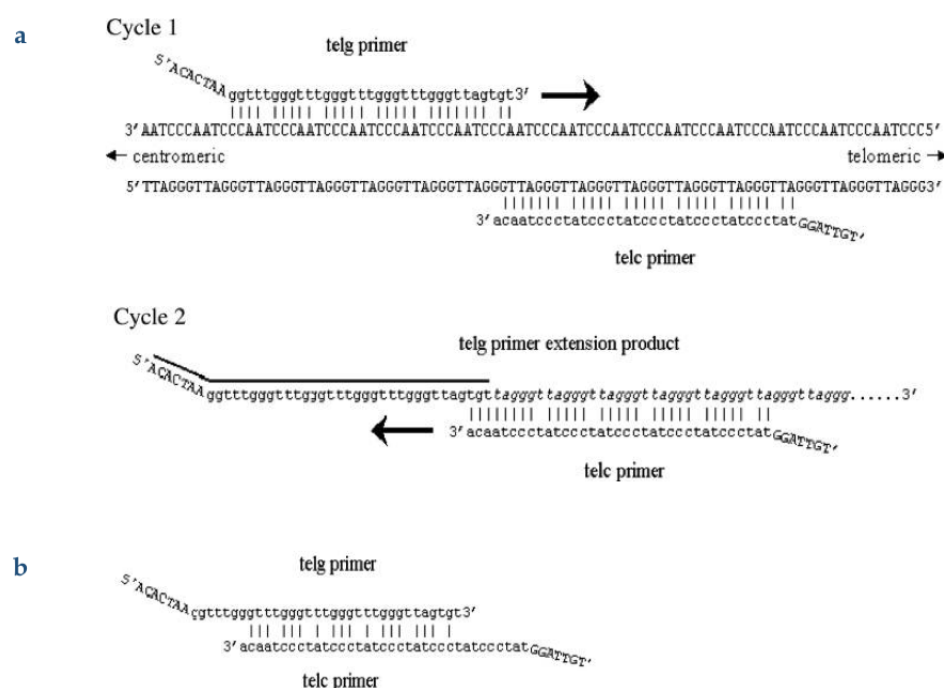


FIGURE 17 – Principe de l'amplification des répétitions télomérique dans le test « Mesure de la longueur des télomères », tel que décrit par Cawthon (Cawthon 2009). a, fonctionnement successifs des amorces télomériques (*telg* et *telc*). b, stratégie mise en place pour empêcher la dimérisation de *telg* et *telc*.

Un problème attendu suite à l'utilisation de la qPCR est la formation de dimères d'amorces télomériques. Celles-ci étant constituées d'une séquence répétée, leur complémentarité est en effet élevée (Cawthon 2009 ; Cawthon 2002 ; Montpetit et al. 2014). Pour empêcher la formation de ces dimères, les amorces télomériques ont été dessinées de telle manière qu'elles contiennent 7 mésappariements et, surtout, que l'amplification de tels dimères soit rendue impossible par la présence d'un mésappariement à l'extrémité 3' de chaque amorce (Figure 17b) (Cawthon 2009).

La technique de Cawthon est dite monochromatique, parce qu'elle utilise un seul type de fluorescence. Comme nous l'avons mentionné dans la discussion du test « Mesure de l'activité de la télomérase », seul un agent intercalant (comme le SYBR Green) peut être utilisé dans ce genre de qPCR. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de la méthode développée par Cawthon : étant donné que les amorces télomériques se chevauchent, l'insertion d'une sonde spécifique est impossible. La quantification par l'utilisation de l'agent intercalant SYBR Green est relativement simple : il se fixe à toute séquence d'ADN double brin (qui correspond à de l'ADN amplifié), ce qui provoque son émission de fluorescence (Figure 18). A cause de sa nature aspécifique, l'utilisation du SYBR Green peut créer des artéfacts (bruit de fond plus élevé, amplification de produits aspécifiques). Cependant, ce problème peut être contrecarré par l'analyse des courbes de dissociation (*melting curves*) (Jodczyk 2011). Chaque séquence amplifiée ayant une taille et une nature différentes, leur température et cinétique de dénaturation seront distinctes. Leurs courbes de fusion seront donc différentes, ce qui permet de détecter la présence d'amplicons distincts au terme d'une réaction de PCR (Life Technologies n.d.).

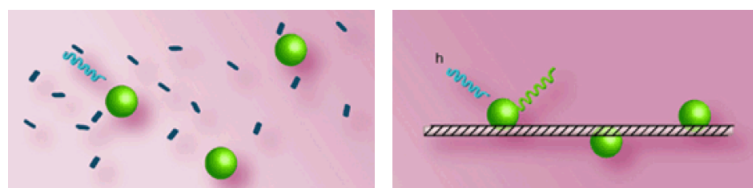


FIGURE 18 – Principe de qPCR utilisant un agent intercalant (par exemple, le SYBR Green) (Parida et al. 2008).

Pour amplifier deux produits au sein d'une même réaction en monochromatique, Cawthon utilise un protocole bien particulier qui repose sur (1) la courbe d'amplification relative des séquences télomériques par rapport au gène de l'albumine et (2) sur la stabilité thermique différentielle des amplicons attendus (Figure 19). L'approche consiste à collecter le signal d'amplification de chaque produit à des moments différents. La séquence télomérique à amplifier étant abondante, le signal d'amplification atteindra l'indice C_p durant les premiers cycles de PCR, alors que le signal correspondant à l'albumine (cible présente en une seule copie allélique) n'aura pas encore augmenté au delà de la ligne de fond correspondant au démarrage de la PCR. Plus tard dans les cycles, la température des étapes d'élongation sera augmentée pour dépasser la température de fusion (T_m) du produit télomérique, température à laquelle celui-ci est rendu simple brin et son signal est revenu au bruit de fond. A cette température, par contre, les amplicons pour le gène de l'albumine ne sont pas dénaturés et peuvent donc continuer à être amplifiés jusqu'à atteindre le seuil de détection auquel est associé l'indice C_p qui est donc enregistré à cette température largement supérieure à la température de fusion du produit télomérique. Pratiquement, ceci est réalisé en aug-

mentant la température de fusion du produit d'amplification de l'albumine, grâce à l'ajout d'une queue GC à l'extrémité 5' de chaque amorce de ce gène (Cawthon 2009).

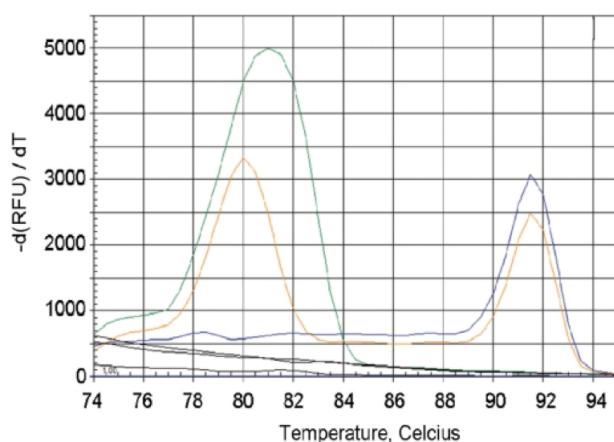


FIGURE 19 – Melting curves illustrant la technique d'amplification en *multiplex* par SYBR Green, telle que décrite par Cawthon (Cawthon 2009). Les courbes sont celles obtenues pour l'amplification *singleplex* des télomères (vert), l'amplification *singleplex* de l'albumine (bleu) et pour l'amplification *multiplex* des télomères et de l'albumine (orange).

In fine, cette méthode fournit une longueur relative des télomères, puisque le résultat (C_p) d'amplification télomérique (appelé T) est rapporté à celui du gène de l'albumine (appelé S, pour *Single-copy gene*). La longueur relative des télomères est ainsi exprimée par le ratio T/S (Cawthon 2009 ; Cawthon 2002 ; Jodczyk 2011).

Une fois la méthode de mesure sélectionnée, l'objectif est de l'utiliser pour observer l'évolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des passages d'une culture « long terme ». Cette dernière consiste à cultiver les cellules jusqu'à l'arrêt de la croissance, ce qui revient en moyenne à réaliser une dizaine de passages (≈ 60 jours). Chez *Celyad*, la culture « long terme » est un test à part entière destiné à observer le ralentissement et l'arrêt de la prolifération cellulaire (correspondant à l'activation de la sénescence réplivative) avec les passages. Le but du test « Mesure de la longueur des télomères » est de corréler un arrêt prolifératif avec un raccourcissement des télomères. Deux cas de figures sont ainsi possibles :

- Le ratio T/S diminue au fur et à mesure des passages, témoignant d'un raccourcissement des télomères. Cela signifie que les mécanismes d'allongement des télomères ne sont pas suffisamment actifs pour compenser ce raccourcissement. Dans ce cas, les cellules ne sont pas considérées comme tumorales ;
- Le ratio T/S reste constant au fur et à mesure des passages, témoignant d'une forte activité de rallongement des télomères. L'échantillon est alors considéré comme tumorigène.

V.C.2 Matériel et méthodes

Les méthodes décrites ci-dessous correspondent au protocole initial du test. Son développement mènera à des modifications des détails de ces méthodes, qui seront discutées dans la section suivante.

V.C.2.1. Contrôles

Deux types de contrôles sont pris en compte dans la réaction de qPCR :

- De l'ADN génomique humain pur (*Promega*, #G3041) est utilisé comme contrôle positif et échantillon de référence ;
- De l'eau *PCR grade* constitue le contrôle négatif de la réaction de qPCR.

V.C.2.2. Echantillons cellulaires

Pour le développement de ce test, deux lignées tumorales ont été utilisées comme échantillons positifs, en ce sens que la longueur de leurs télomères est théoriquement stable au fil des passages. Il s'agit des lignées HT1080 et A549, dont l'origine a été évoquée dans le test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Dans le but d'observer une diminution de la longueur des télomères au fur et à mesure des passages, deux lots C-Cure® ont été utilisés.

Chaque échantillon cellulaire a été soumis au protocole de culture « long terme ».

V.C.2.3. Culture « long terme »

- *Cellules C-Cure®**

Dans ce type de culture, les cellules issues du processus de C-Cure® sont cultivées au-delà du dernier passage du produit de thérapie cellulaire (P3). Celles-ci sont d'abord semées dans une flasque de culture T175 à 4 800 cellules par cm² dans une solution SMe/2,5% hPL. Un passage est réalisé à chaque fois que la confluence atteint 85 ± 5% (avec une durée maximale de 14 jours entre chaque passage), et ce jusqu'à ce que les cellules montrent un arrêt de croissance et/ou une mort cellulaire conséquente. A chaque passage, les cellules excédentaires sont cryopréservées.

- *Cellules HT1080 et A549*

Pour leur culture long terme, les cellules HT1080 et A549 sont semées dans une flasque de culture T175 à 5 100 cellules par cm² dans une solution SMe/5% hPL. Pour les HT1080, un passage est réalisé tous les 3 jours (quelle que soit la confluence). Pour les

A549, les directives de culture cellulaire précédemment mentionnées sont suivies (passage à $85 \pm 5\%$ de confluence, changement de milieu tous les 4 jours). A chaque passage, les HT1080 et A549 sont échantillonnées sous forme d'un culot sec de 500 000 cellules et cryopréservées.

V.C.2.4. Extraction et quantification d'ADN génomique

L'extraction et la quantification d'ADN sont réalisés selon la procédure décrite précédemment dans la section « Détection des mutations ALT » (sections V.B.2.2 et V.B.2.3), mais en utilisant des culots secs de 500 000 cellules et en omettant l'étape d'ajout de RNase A pour l'extraction.

V.C.2.5. Réactions de qPCR

Pour le test « Mesure de la longueur des télomères », la technique de qPCR *multiplex* monochromatique de Cawthon avait été sélectionnée. Lors du développement du test, l'utilisation de la méthode *multiplex* (dont le protocole est détaillé dans l'Annexe 4) n'a cependant pas montré de résultats encourageants. Pour des raisons qui seront discutées dans une prochaine section, le *multiplex* a été abandonné au profit du *singleplex*. Nous présentons donc ici le protocole de la méthode *singleplex*.

- *Préparation des amorces*

Les amorces sens (*telg*) et anti-sens (*telc*) pour les télomères et les amorces sens (*albd*) et anti-sens (*albu*) pour le gène de l'albumine, dont les séquences sont présentées au Tableau 26, sont synthétisées par la firme IDT et sont diluées pour atteindre la concentration de 10 μ M.

- *Préparation des mix de la réaction de qPCR*

Deux mélanges de réaction doivent être préparés : un pour l'amplification des télomères et un pour l'amplification du gène de l'albumine. Pour cela, le kit « LightCycler® 480 SYBR Green I Master » (Roche, #04707516001) est utilisé. Seize microlitres du mix présentés au Tableau 27 sont ajoutés à chaque puits d'une plaque 96-puits. Le « Master » contient l'ADN Polymérase FastStart Taq, le tampon de réaction, un mix de dNTPs (où les dTTPs ont été remplacés par des dUTPs), le SYBR Green I et du $MgCl_2$.

Tableau 26 – Séquence des amorces sens et anti-sens pour l'amplification des répétitions télomériques et de l'albumine (Cawthon 2009). Les séquences sont notées de 5' en 3'.

PRODUIT	AMORCE SENS	AMORCE ANTI-SENS
Télomères	ACACTAAGGT- TTGGGTTTGG- GTTTGGGTTTG- GGTTAGTGT	TGTTAGGTAT- CCCTATCCCT- ATCCCTATCCCT- ATCCCTAACA
Albumine	CGGCGGCGGG- CGGCGCGGGC- TGGGCGGAAAT- GCTGCACAG- AATCCTTG	GCCCGGCCC- GCCGCGCCCG- TCCCGCCGGA- AAAGCATGGT- CGCCTGTT

Tableau 27 – Composition des mélanges de réaction qPCR *singleplex* pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.

	RÉACTIF	MÉLANGE TÉLOMÈRES	MÉLANGE ALBUMINE	RÉFÉRENCE
Télomères	Amorce sens (<i>telg</i>)	2 µL	N/A	IDT
	Amorce anti-sens (<i>telc</i>)	2 µL	N/A	IDT
Albumine	Amorce sens (<i>albd</i>)	N/A	2 µL	IDT
	Amorce anti-sens (<i>albu</i>)	N/A	2 µL	IDT
	Master	10 µL	10 µL	Roche, #04707516001
	H ₂ O PCR grade	2 µL	2 µL	Roche, #04707516001

- *Préparation des échantillons et du contrôle*

L'ADN génomique extrait à partir des échantillons cellulaires et l'ADN génomique humain pur sont dilués pour atteindre une concentration de 12,5 ng/µL. Quatre microlitres de cette dilution sont ajoutés dans les puits correspondant de la plaque 96-puits. Chaque échantillon est analysé en triplicat.

- *Programme de qPCR*

Une fois le mélange de réaction et les échantillons disposés dans la plaque, celle-ci est placée dans le LightCycler® 480 II (Roche). La dénaturation, l'hybridation et

l'amplification est alors réalisée grâce au programme de cycles thermiques présenté au Tableau 28.

Tableau 28 – Programme de cycles thermiques de la qPCR *singleplex* pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.

PROGRAMME	NOMBRE DE CYCLES	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (HH:MM:SS)	MODE
Dénaturation	1	95	00:15:00	N/A
Hybridation	2	94	00:00:15	N/A
		49	00:00:15	N/A
		94	00:00:15	N/A
Amplification	32	62	00:00:10	N/A
		74	00:00:15	Acquisition

V.C.2.6. Méthodes mathématiques

- *Calcul du ratio T/S*

La longueur relative des télomères est déterminée par le calcul d'un rapport entre l'amplification des répétitions télomériques et de la séquence du gène de l'albumine : le ratio T/S. Celui-ci est calculé pour chaque échantillon ainsi que pour la référence (ADN génomique humain pur) par la formule suivante :

$$\text{Ratio T/S} = \left[\frac{2^{C_p(\text{télomères})}}{2^{C_p(\text{albumine})}} \right]^{-1} = 2^{-\Delta C_p}$$

La valeur obtenue pour chaque échantillon est ensuite divisée par la valeur obtenue pour l'ADN génomique de référence.

- *Calcul de l'efficacité de la réaction de qPCR*

L'efficacité de chaque réaction de qPCR a été calculée en utilisant 7 quantités différentes d'ADN : 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng et 2,5 ng. Les valeurs de C_p obtenues en fonction du logarithme (en base 10) de la quantité d'ADN sont mises en graphe et une relation de tendance linéaire y est placée. La pente de cette droite est utilisée dans le calcul de l'efficacité :

$$E(\%) = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

V.C.3 Développement et optimisation de la méthode

Pour le développement de ce test, une stratégie en trois phases a été mise sur pied. Dans un premier temps, la méthode décrite par Cawthon a été testée en *singleplex* afin de prouver le bon fonctionnement des amorces et de la réaction qPCR de manière générale. Une fois ceci réalisé, nous sommes passés en *multiplex* en tenant compte des améliorations apportées lors des développements réalisés en *singleplex*. Finalement, le ratio T/S a été calculé pour tous les passages de la culture long terme dans le but d'observer son évolution. Cette partie du mémoire a porté sur la vérification du concept de ce test (autrement dit, sur sa faisabilité).

V.C.3.1. Méthode *singleplex*

L'utilisation initiale de la méthode de Cawthon en *singleplex* a mis deux dysfonctionnements en évidence. Le premier problème identifié est la présence d'un signal non négligeable (Tableau 29,⁽¹⁾) pour l'eau *PCR grade* (contrôle négatif) lors de l'amplification des télomères. Ceci est associé à une efficacité de réaction évaluée à 222%, ce qui signifie qu'à chaque cycle, le nombre de copies du produit télomérique devient 4,44 fois plus important. Cette efficacité est largement supérieure à l'intervalle acceptable (90-110%) (Taylor et al. 2011). Une investigation a permis de mettre en évidence que le produit présent dans le contrôle négatif possède la même température de fusion (Figure 20a) (79,7°C) et la même taille (Figure 20b) (< 100 pb) que le produit d'amplification attendu. Dans ce sens, il s'agit probablement d'un dimère provoqué par le chevauchement complet des amorces télomériques.

Tableau 29 – Résultats préliminaires de la qPCR *singleplex*. Ce tableau présente la moyenne des résultats de 6 expériences indépendantes. ND : non détecté.

ECHANTILLON	Télomères		Albumine	
	CP MOYEN	SD	CP MOYEN	SD
ADN extrait	20,68	1,19	25,39 ⁽²⁾	0,78
ADN génomique pur	16,92	0,65	21,64 ⁽²⁾	0,72
H ₂ O <i>PCR grade</i>	23,24 ⁽¹⁾	1,90	ND	ND

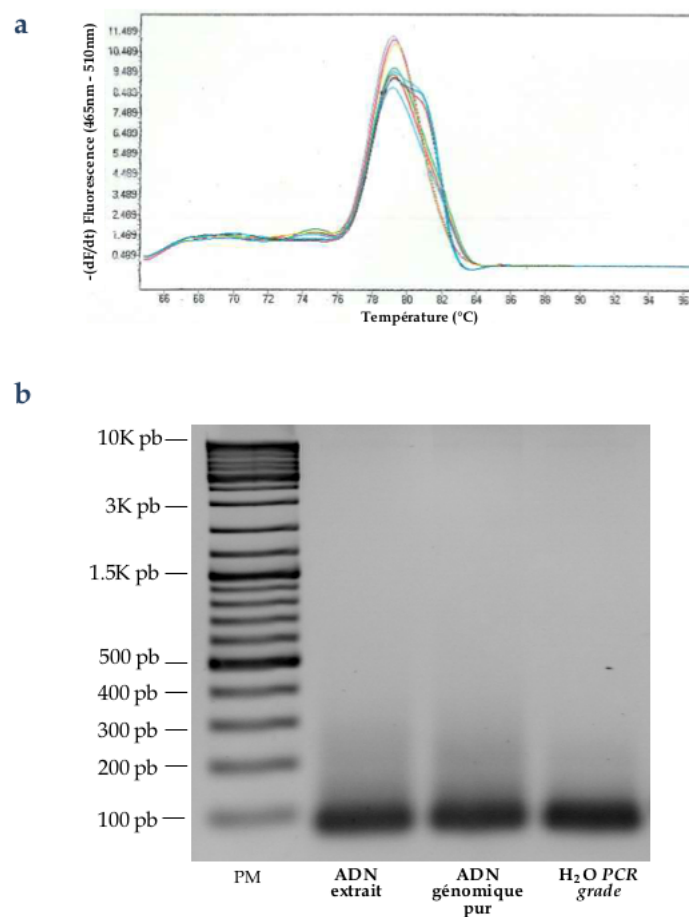


FIGURE 20 – Investigation menée suite au problème de présence d’un signal dans le contrôle négatif pour l’amplification télomérique. a, *melting curves* de l’ADN extrait (en jaune), de l’ADN génomique pur (en bleu) et de l’eau *PCR grade* (en rouge). b, gel 3% agarose/TAE réalisé sur les produits d’amplification télomérique. PM : échelle de poids moléculaire.

La deuxième anomalie observée lors de l’utilisation du *singleplex* est un décalage d’environ 4 cycles entre l’ADN extrait et l’ADN génomique pur pour l’amplification du gène de l’albumine (Tableau 29,⁽²⁾). Cela peut s’expliquer par un problème de pureté de l’ADN présent dans l’échantillon extrait, et donc par la qualité de l’extraction.

- *Optimisation de la concentration en amorces télomériques*

La présence d’un signal dans l’eau *PCR grade* pour l’amplification des télomères semble inévitable, car intrinsèquement liée à la conception de la méthode de qPCR. En effet, cette observation est très certainement due à la formation de dimères d’amorces de même taille que le produit d’amplification. Parce que les amorces *telg* et *telc* se chevauchent à leur extrémité 3’, elles peuvent s’apparier de manière aspécifique, avant l’étape d’extension de *telg* (Figure 17a, cycle 1).

Plutôt que de changer d'amorces, l'accent a donc été mis sur une optimisation visant à diminuer ce signal non désiré, c'est-à-dire à augmenter le C_p de l'eau *PCR grade* pour l'amplification télomérique. Pour cela, diverses concentrations en amorces télomériques ont été testées. La concentration en amorces est en effet un facteur déterminant dans le phénomène de dimérisation (Brownie et al. 1997). Des concentrations différenciées pour *telg* et pour *telc* ont également été testées, car cette adaptation avait été utilisée par Cawthon dans la description de sa première technique de mesure de longueur des télomères (Cawthon 2002).

Tableau 30 – Résultats de plusieurs concentrations en *telg* et *telc*. Le Δ représente la soustraction des Cp de deux types d'échantillon. La concentration utilisée dans le protocole initial est mise en évidence en gras ($[telg] = 1\ 000\ \text{nM}$; $[telc] = 1\ 000\ \text{nM}$).

		ADN extrait ⁽¹⁾				ADN génomique pur ⁽²⁾				H ₂ O PCR grade ⁽³⁾							
<i>[telg]</i> (nM)	<i>[telc]</i> (nM)	Cp	SD	Cp	SD	Cp	SD	Cp	SD	Cp	SD	$\Delta(3-1)$	$\Delta(3-2)$	$\Delta(1-2)$			
5 000	5 000	17,79	0,09	15,71	0,03	18,78	0,02	0,99	3,07	2,08							
2 000	2 000	18,06	0,11	15,72	0,01	19,62	0,03	1,56	3,90	2,34							
1 000	1 000	18,81	0,03	16,32	0,10	20,71	0,01	1,90	4,39	2,49							
500	500	20,34	0,15	17,97	0,17	22,54	0,05	2,20	4,57	2,37							
300	300	20,69	0,06	18,23	0,02	24,52	0,03	3,83	6,29	2,46							
200	200	21,81	0,04	19,63	0,01	26,59	0,22	4,78	6,96	2,18							
100	100	21,65	0,02	19,24	0,23	27,67	0,27	6,02	8,43	2,41							
100	300	20,66	0,04	18,23	0,05	26,35	0,1	5,69	8,12	2,43							
100	500	19,96	0,09	17,51	0,06	25,59	0,11	5,63	8,08	2,45							
300	100	21,71	0,15	19,19	0,03	25,1	0,14	3,39	5,91	2,52							
300	500	19,54	0,02	17,11	0,04	23,38	0,11	3,84	6,27	2,43							
300	900	19,95	0,05	16,91	0,01	24,03	0,08	4,08	7,12	3,04							
500	100	21,33	0,12	18,94	0,07	23,87	0,03	2,54	4,93	2,39							
500	300	20,27	0,07	17,91	0,08	22,75	0,22	2,48	4,84	2,36							

Afin de prendre la mesure de l'efficacité de chaque combinaison des différentes concentrations en *telg* et en *telc*, trois indices Δ ont été calculés :

- le $\Delta(3 - 1)$ représente la différence de signal (associé au C_p de l'amplification) entre l'eau *PCR grade* et l'ADN extrait ;
- Le $\Delta(3 - 2)$ représente la différence de signal entre l'eau *PCR grade* et l'ADN génomique pur ;
- le $\Delta(1 - 2)$ représente la différence de signal entre l'ADN génomique pur et l'ADN extrait. Il est calculé dans le but de vérifier que l'amplification des répétitions télomériques est stable dans les échantillons nucléotidiques, quelque soit la concentration en amorces *telg* et *telc*.

Comme présenté au Tableau 30, trois combinaisons de concentrations d'amorces permettent une nette augmentation du C_p du contrôle négatif et, *de facto*, une augmentation non négligeable du $\Delta(3 - 1)$ et du $\Delta(2 - 1)$, autrement dit de l'écart entre le contrôle négatif et les échantillons d'ADN (extrait ou génomique pur). Il est important de mentionner que l'augmentation de cet écart avec l'eau *PCR grade* n'est pas associée à une modification de l'écart de C_p entre l'ADN extrait et l'ADN génomique, puisque le $\Delta(1 - 2)$ se stabilise aux alentours de 2,4 cycles. Ces combinaisons, en gras dans le Tableau 30, sont :

- [*telg*] = 100 nM et [*telc*] = 100 nM ;
- [*telg*] = 100 nM et [*telc*] = 300 nM ;
- [*telg*] = 100 nM et [*telc*] = 500 nM.

Bien que l'utilisation des deux premières combinaisons permettent d'obtenir des $\Delta(3 - 1)$ et $\Delta(2 - 1)$ plus élevés que la dernière, les courbes de dissociation de leurs produits d'amplification montrent un épaulement (Annexe 5, Figure 32). Pour cette raison, nous avons sélectionné la combinaison [*telg*] = 100 nM et [*telc*] = 500 nM pour la suite du développement du test. Ainsi, le signal obtenu pour l'eau *PCR grade* est reculé de 4,88 cycles. On estime que, à cette concentration, le signal dû à la dimérisation des amorces ne participe que pour 2,02% du signal observé dans les échantillons d'ADN extrait et génomique pur (alors qu'il était à 17,69% avec la concentration initiale de 1 μ M).

De plus, l'utilisation de cette combinaison a permis de réduire l'efficacité à 145,5%, inférieure à celle obtenue pour les concentrations initiales en amorces télomériques, mais toujours supérieure au seuil acceptable de 110%.

MODIFICATION DU « MATÉRIEL ET MÉTHODES » INITIAL

L'amorce *telg*, obtenue en concentration stock de 10 μM est diluée à 1 μM (pour atteindre une concentration finale de 100 nM dans le puits). L'amorce *telc*, quant à elle, est diluée à 5 μM (pour atteindre une concentration finale de 500 nM dans le puits).

- *Modification de la température d'hybridation*

Pour augmenter le C_p obtenu pour le contrôle négatif correspond à l'eau *PCR grade* de l'amplification télomérique, nous avons également joué sur la température d'hybridation des amorces, initialement fixée à 49°C. À des températures très inférieures à la dénaturation de l'ADN, les amorces télomériques peuvent plus facilement s'hybrider l'une à l'autre. Dans une optique de diminution de la dimérisation, nous avons augmenté celle-ci à 55°C. Bien que cela recule le signal détecté à partir de l'eau à 27,15 cycles, cela résulte également en une augmentation du C_p de l'ADN extrait. L'écart entre l'ADN extrait et l'ADN génomique ($\Delta(1-2)$) n'est donc plus stable (Tableau 31). Pour cette raison, nous avons maintenu la température d'hybridation à 49°C.

Tableau 31 – Résultats de la modification de la température d'hybridation des amorces sur l'amplification du produit télomérique.

T° D'HYBRIDATION (°C)	ADN extrait ⁽¹⁾		ADN génomique pur ⁽²⁾		H ₂ O PCR grade ⁽³⁾				
	C _P	SD	C _P	SD	C _P	SD	$\Delta(3-1)$	$\Delta(3-2)$	$\Delta(1-2)$
49	19,96	0,09	17,51	0,06	25,59	0,11	5,63	8,08	2,45
55	21,48	0,25	17,98	0,07	27,15	0,13	5,67	9,17	3,50

- *Optimisation de l'extraction d'ADN*

Comme nous l'avons mentionné, la différence de Cp entre l'ADN extrait et l'ADN génomique pur peut être due à un problème de pureté et/ou de qualité de l'ADN extrait. Afin de résoudre ce problème, la méthode d'extraction d'ADN a donc été optimisée sur deux fronts principaux : un traitement à la RNase, et la quantité cellulaire utilisée pour l'extraction.

La technique d'extraction utilisée dans ce mémoire permet une co-purification de l'ADN et de l'ARN. La présence d'ARN dans un échantillon inhibe certaines réactions enzymatiques, mais pas une réaction de qPCR (Qiagen 2003). Cependant, étant donné qu'il s'agit d'une molécule oligonucléotidique, la présence d'ARN peut influencer le résultat de la qPCR. Ainsi, pour éliminer toute trace d'ARN, un traitement à la RNase A (ribonucléase pancréatique) a été réalisé et le résultat de qPCR obtenu avec traitement a été comparé au résultat obtenu sans traitement RNase.

Comme le Tableau 32 le montre, l'ajout d'un traitement à la RNase A dans le protocole d'extraction d'ADN provoque un rapprochement des Cp de l'ADN extrait et de l'ADN génomique pur (de 3,84 cycles, on passe à 0,3 cycles d'écart). Ces résultats peuvent être interprétés en termes de compétition entre de l'ARN et de l'ADN pour la purification sur résine de silicates. En effet, en absence de RNase A, de grandes quantités d'ARN sont présentes dans l'échantillon. Parce qu'il est présent en plus grand nombre de copies, celui-ci se fixe préférentiellement sur la colonne de purification, réduisant donc la fixation et l'extraction de l'ADN. L'amplification de l'albumine est donc retardée, car la quantité réelle d'ADN présent dans l'échantillon est inférieure à la quantité calculée au NanoDrop (qui ne permet pas une discrimination nette de l'ARN et de l'ADN).

Tableau 32 – Résultats de l'ajout d'un traitement à la RNase A lors de l'extraction d'ADN. ND : non détecté.

ECHANTILLON	Albumine	
	Cp	SD
ADN extrait (sans RNase)	25,49	0,05
ADN extrait (avec RNase)	21,95	0,05
ADN génomique pur	21,65	0,07
H ₂ O PCR grade	ND	ND

Pour cette raison, le traitement RNase A a été sélectionné pour la méthode d'extraction d'ADN.

MODIFICATION DU « MATÉRIEL ET MÉTHODES » INITIAL

4 μL de RNase A (*Qiagen*, #19101) doivent être ajoutés avant de placer l'échantillon sur la colonne de purification.

L'efficacité de l'extraction d'ADN a également été évaluée en utilisant différentes quantités de cellules (de 250 000 à 1,25 millions). Ceci a tout d'abord permis de mettre en évidence la linéarité de la méthode d'extraction, le coefficient de détermination R^2 (mesure statistique de la qualité de prédiction de la régression linéaire) étant de 0,9402 (Figure 21).

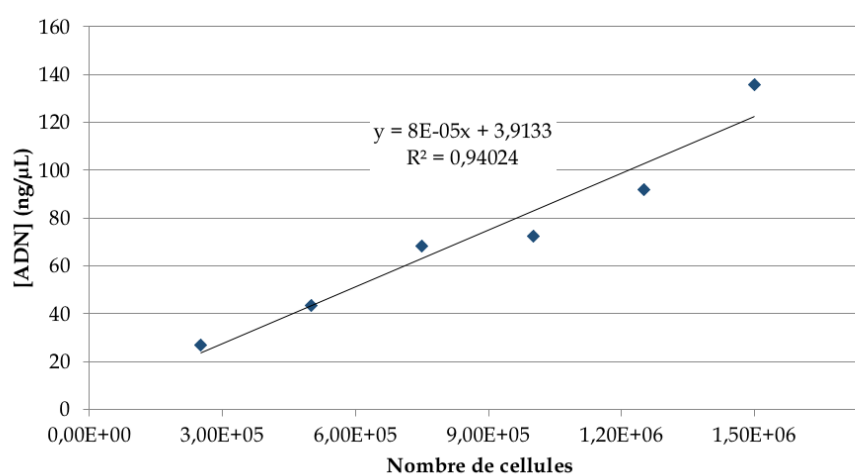


FIGURE 21 – Graphique présentant la concentration d'ADN récolté après extraction en fonction du nombre de cellules utilisées dans l'extraction.

La qPCR *singleplex* a ensuite été réalisée en utilisant l'ADN extrait à partir de ces différentes quantités cellulaires. Les résultats sont présentés au Tableau 33. On observe ainsi que l'efficacité de la réaction de qPCR dépend de la quantité de cellules utilisées lors de l'extraction d'ADN. En effet, pour l'amplification du produit télomérique comme de la séquence codant pour l'albumine, on observe une stabilisation du C_p lorsque le nombre de cellules augmente. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à partir d'un certain nombre de cellules, la colonne de purification est saturée en ADN. Ainsi, cela minimiserait la co-purification d'impuretés (ARN, protéines, nucléases, etc), qui pourraient influencer sur la réaction de qPCR. Par sécurité, nous avons donc sélectionné l'utilisation d'un million de cellules pour l'extraction d'ADN.

Tableau 33 – Influence du nombre de cellules utilisées dans l'extraction d'ADN sur le Cp de la réaction de qPCR. En gras, le nombre de cellules initialement utilisé dans le protocole d'extraction d'ADN (basé sur le protocole d'extraction d'ARN établi en tant que SOP chez *Celyad*).

ECHANTILLON	Télomères		Albumine	
	Cp	SD	Cp	SD
2,50E+05	18,85	0,05	23,25	0,02
5,00E+05	18,64	0,57	22,61	0,02
7,50E+05	17,69	0,10	22,17	0,02
1,00E+06	17,69	0,08	22,02	0,03
1,25E+06	17,29	0,20	21,77	0,03
1,50E+06	17,35	0,11	21,87	0,08

MODIFICATION DU « MATÉRIEL ET MÉTHODES » INITIAL

Lors de la culture long terme de C-Cure® et des cellules tumorales contrôles, 1 000 000 de cellules doivent être récoltées à chaque passage, pour ensuite être soumises au protocole d'extraction d'ADN.

V.C.3.2. Passage en *multiplex*

Une fois la méthode *singleplex* optimisée, la technique *multiplex* décrite par Cawthon peut être utilisée, en tenant compte des modifications effectuées selon les sections précédentes. Cependant, l'utilisation du *multiplex* a mis en lumière trois problèmes supplémentaires :

- Le signal obtenu à partir de l'eau *PCR grade* pour l'amplification télomérique est plus important que celui obtenu après optimisation de la qPCR *singleplex* (Tableau 34,⁽¹⁾).
- Le contrôle négatif de l'amplification de la séquence codant pour l'albumine montre également un signal, ce qui n'était pas le cas en *singleplex* (Tableau 34,⁽²⁾).
- L'analyse des courbes de dissociation semble indiquer que le produit télomérique ($T_m \approx 80^\circ\text{C}$) n'est pas amplifié, étant donné qu'aucun pic n'est identifiable aux alentours de 80°C . Le produit d'amplification du gène de l'albumine ($T_m \approx 91^\circ\text{C}$), quant à lui, est bien présent. Sur les courbes de dissociation de la réaction *multiplex*, on observe également qu'un produit différent est amplifié dans l'eau *PCR grade* (Figure 22).

Ces trois problèmes semblent liés, puisqu'ils témoignent d'une amplification supplémentaire et/ou inattendue. Ainsi, nous suspectons qu'ils soient dus à un problème lors

Tableau 34 – Résultats de la qPCR *multiplex*. Les résultats présentés ont été obtenus en faisant la moyenne de trois expériences indépendantes.

ECHANTILLON	Télomères		Albumine	
	CP MOYEN	SD	CP MOYEN	SD
ADN extrait	18,91	0,21	21,10	0,22
ADN génomique pur	18,42	0,02	20,61	0,02
H ₂ O PCR <i>grade</i>	22,13 ⁽¹⁾	0,44	24,73 ⁽²⁾	0,50

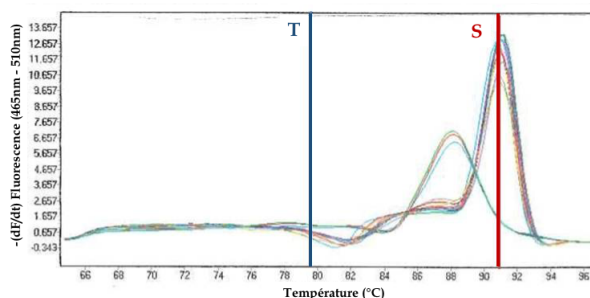


FIGURE 22 – Melting curve de la réaction de qPCR *multiplex*. Les courbes montrant un pic aux alentours de 88°C sont celles du triplicat de l'eau PCR *grade*. Les autres sont celles de l'ADN extrait et de l'ADN génomique pur. Les T_m des télomères (ligne bleue) et du gène de l'albumine (ligne rouge) ont été placées sur le graphique.

de la mise en présence des amorces télomériques et du gène de l'albumine.

Afin de vérifier l'origine de ces trois problèmes, une investigation a été menée. Pour cela, deux mélanges contenant les amorces *telg/telc* et chaque amorce du gène de l'albumine séparément (*albd* ou *albu*) ont été utilisés pour lancer la réaction de qPCR *multiplex*. Normalement, seules les répétitions télomériques devraient être amplifiées dans ce cas-ci ; sur les courbes de dissociation, cela se traduirait par la présence d'un pic à environ 80°C. Les courbes de dissociation obtenues à partir de ces mélanges sont présentées à l'Annexe 5 (Figure 33). Cette expérience a permis d'observer la présence d'un produit d'amplification inattendu ($T_m \approx 88^\circ\text{C}$) lors de l'utilisation de l'amorce *albd*. Etant donné qu'un BLAST n'a pas permis de conclure que l'apparition de ce signal est due à l'amplification d'un produit suite à la combinaison de l'amorce *albd* et *telg* ou *telc*, l'hypothèse d'hybridation des amorces l'un à l'autre est plus vraisemblable. En effet, les amorces destinées à l'amplification de la séquence codant pour l'albumine possèdent une queue GC de taille relativement importante (20 pb) en 5'. De plus, les amorces télomériques ont été conçues sur base du schéma répétitif des télomères, et possèdent donc des régions GC au sein de leur séquence. L'expérience a été reproduite en utilisant le gène de l'hémoglobine gamma comme référence, à la place du gène de l'albumine. Les amorces pour l'amplification de l'hémoglobine gamma sont conçues

sur le même principe que pour l'amplification de l'albumine. En utilisant ce gène, la même observation a été faite (Annexe 5, Figure 34). Tous ces éléments nous poussent à croire en un phénomène de dimérisation des amorces *albd* et *telg* ou *telc*, rendu possible par la mise en présence de celles-ci lors de la réaction de qPCR *multiplex*. Ceci expliquerait la présence d'un produit supplémentaire lors de l'amplification des échantillons oligonucléotidiques (ADN extrait et ADN génomique pur), et d'une amplification à partir de l'eau *PCR grade*.

Pour ces raisons, la technique *multiplex* a été abandonnée et la méthode *singleplex* optimisée a été sélectionnée pour la suite du développement du test « Mesure de la longueur des télomères ».

V.C.3.3. Evolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des passages

La dernière étape de la détermination de la faisabilité de ce test consiste à observer l'évolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des passages. Pour cela, des cellules C-Cure® (3 lots) et deux lignées tumorales (HT1080 et A549) ont été cultivées sur le long terme et le ratio T/S a été calculé pour chaque passage. Les résultats sont présentés à la Figure 23, sous la forme d'un graphique du ratio T/S en fonction du cPD (*Cumulative Population Doubling*), qui représente les doublements cumulativement effectués par les cellules après chaque passage. Deux observations ont été faites sur base de ces résultats. Tout d'abord, le ratio T/S des lignées tumorales est relativement stable au cours des passages, ce qui correspond au résultat attendu. En ce qui concerne les lots C-Cure®, par contre, le résultat est contraire aux attentes (on s'attendait à une diminution du ratio T/S, corrélée à un raccourcissement des télomères) et la tendance est moins nette. En effet :

- le lot C-Cure® 1 montre une forte augmentation du ratio T/S au fur et à mesure des passages ;
- le ratio T/S des lots C-Cure® 2 et 3 est relativement stable.

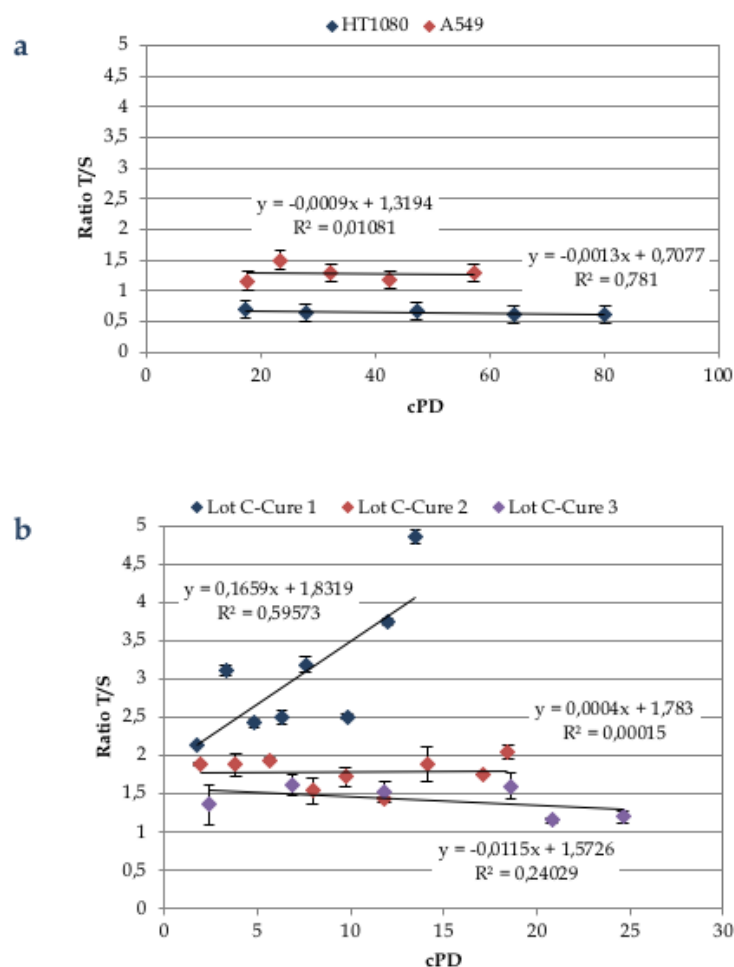


FIGURE 23 – Graphiques montrant l'évolution du ratio T/S en fonction du cPD. A, évolution du ratio T/S de deux lignées tumorales contrôle (HT1080 et A549). B, évolution du ratio T/S de deux lots de cellules C-Cure®.

Il est très peu probable que l'augmentation et la stabilisation observée pour ces deux lots traduise d'une immortalisation cellulaire, étant donné que le PDT (*Population Doubling Time*, c'est-à-dire le temps nécessaire pour la population cellulaire double entre chaque passage) de ces trois lots augmente tout au long de la culture long terme (Annexe 5, Tableau 49). Cela traduit d'un ralentissement de la prolifération cellulaire, incompatible avec une immortalisation.

L'observation de la stabilisation du ratio T/S pour les lots C-Cure® 2 et 3 est plus que probablement due à un manque de sensibilité de la méthode.

Pour comprendre l'origine de l'augmentation du ratio T/S pour le lot C-Cure® 1, une analyse individuelle des Cp de l'amplification des télomères et du gène de l'albumine a été effectuée (Annexe 5, Figure 35). Celle-ci nous a mené à penser que le problème à l'origine de l'augmentation du ratio T/S réside dans l'amplification de la séquence codant pour l'albumine. En effet, le résultat d'amplification des télomères correspond

au résultat attendu, puisque son Cp augmente avec le cPD, ce qui témoigne d'une diminution du nombre de répétitions télomériques (et donc d'un raccourcissement des extrémités chromosomiques). En ce qui concerne la séquence codant pour l'albumine, par contre, son amplification devrait être constante dans le temps étant donné que ce gène est décrit comme présent en une seule copie allélique dans le génome humain. Or, on observe que le Cp de l'amplification de ce gène augmente fortement au fur et à mesure des passages. Une possible explication de ce problème est la diminution de la qualité et/ou de l'intégrité du matériel nucléaire au fil des passages. Plusieurs études ont en effet montré que, sous l'effet d'une culture cellulaire sur le long terme, l'ADN peut être altéré, notamment par l'accumulation de mutations génomiques (Bork et al. 2010 ; Y. Wang et al. 2013). Cette moindre stabilité diminuerait l'efficacité de l'extraction d'ADN, et *in fine* la quantité d'ADN qui se retrouve dans le puits. En effet, bien que la quantité d'ADN obtenue après extraction soit mesurée au spectrophotomètre et normalisée, il se peut qu'une diminution de l'intégrité de l'ADN provoque une réduction de l'extraction d'ADN (modification des affinités avec la colonne de silicates), masquée à la mesure d'absorbance par la co-purification d'autres molécules (protéines et autres impuretés). Dans ce cas, la valeur obtenue au NanoDrop serait une surestimation de la quantité réelle d'ADN présent dans l'échantillon extrait. Et donc, même après normalisation, une quantité moindre d'ADN sera analysée par qPCR.

Le recul du Cp pour l'amplification de la séquence codant pour l'albumine pour ce lot C-Cure® pourrait donc être expliquée par le fait que le matériel extrait à partir de celui-ci est quantitativement et/ou qualitativement différent des deux autres lots. Rappelons que chaque lot C-Cure® provient d'un patient différent et que les cellules qui le composent ont donc un historique différent.

De plus, pour expliquer que ce phénomène n'est pas visible pour l'amplification télomérique, nous pouvons mettre en cause l'efficacité de celle-ci. En effet, comme nous l'avons vu à la section V.C.3.1, les télomères sont amplifiés avec une efficacité supérieure à 100% (145,5%), ce qui implique que la quantité de matériel télomérique sera surestimée lors de l'amplification par qPCR. L'amplification de la séquence codant pour l'albumine, quant à elle, a une efficacité de 99,7%. Son matériel ne sera pas surestimé, ce qui peut expliquer que l'amplification de l'albumine soit plus fortement influencée par une diminution de la quantité d'ADN analysé. Ensuite, nous pouvons évoquer que la nature même des amorces albd et albu est problématique pour cette application. Leur queue GC située en 5' de l'amorce, en tant que séquence répétitive et monotone, peut se fixer ailleurs sur l'ADN et épuiser rapidement la quantité d'amorces. Ceci peut également être responsable d'un retard d'amplification du gène de l'albumine. Finalement, d'autres facteurs peuvent entrer en considération, tels qu'une dégradation

et/ou une compaction moindre des extrémités chromosomiques ou encore une fragilité particulière du chromosome portant le gène de l'albumine.

V.C.4 Discussion

En résumé, une stratégie en plusieurs étapes a permis de vérifier le bon fonctionnement du concept de mesure de la longueur des télomères par qPCR. Chaque étape a vu naître des problèmes inhérents à la technique, ainsi que des solutions permettant l'élimination partielle ou totale de ces problèmes.

Tout d'abord, lors de la phase de développement de la méthode *singleplex*, nous avons observé la dimérisation des amorces télomériques, possible grâce à un chevauchement de 3 pb entre les extrémités 3' de *telg* et *telc*. Jodczyk avait également signalé l'apparition de ce dimère lors de l'utilisation de la méthode de Cawthon (Jodczyk 2011). Ce dernier n'avait cependant pas observé de dimère *telg/telc* de même taille que le produit d'amplification souhaité et, dans l'article décrivant sa méthode, il relate d'ailleurs que ce produit n'est pas suffisamment stable pour être amplifié (Cawthon 2009).

L'apparition de ce dimère durant nos expériences peut ainsi être expliquée par des différences au niveau du mélange de la réaction de qPCR. En effet, alors que nous utilisons le mélange contenu dans un kit (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche), Cawthon y applique une composition spécifique (Tableau 35) (Cawthon 2009).

Tableau 35 – Composition détaillée du mélange de qPCR utilisé par Cawthon (Cawthon 2009).

RÉACTIF	SPÉCIFICATION
SYBR Green I	0,75x
Tris-HCl	10 mM (pH = 8,3)
KCl	3 mM
MgCl ₂	3 mM
dNTP	0,2 mM
DTT	1 mM
Bétaïne	1 M
ADN Polymérase AmpliTaq Gold	0,625 U

Pour diminuer le signal dû à la présence de ce dimère, nous avons tenté d'optimiser la qPCR *singleplex* en agissant sur deux fronts :

- L'augmentation de la température d'hybridation des amorces, ayant pour but

d'empêcher les amorces *telg* et *telc* de s'hybrider entre elles. Les résultats obtenus n'étaient pas concluants ;

- La modification de la concentration en amorces télomériques. La combinaison [*telg*] = 100 nM et [*telc*] = 500 nM a permis de reculer le signal observé avec l'eau *PCR grade* d'environ 5 cycles, réduisant le signal de dimérisation à 2,02% du signal total d'amplification. Cela a également permis de diminuer l'efficacité de 222% à 145,5%, réduisant ainsi la surestimation de l'amplification télomérique.

Bien que l'amplification télomérique ait été optimisée de manière satisfaisante, elle pourrait encore être améliorée. Puisque le dimère n'apparaît pas dans les expériences de Cawthon, il serait tout d'abord intéressant d'utiliser le mélange décrit dans son article. De plus, plutôt que d'utiliser un kit, nous aurions pu concevoir notre propre mélange et l'optimiser en modifiant la concentration en Mg^{2+} . Cet ion est un cofacteur de la polymérase Taq : il favorise l'hydrolyse des dNTP en dNMP, générant ainsi des liens phospho-diester pour l'ajout de nouveaux nucléotides. Pour supprimer l'amplification d'un dimère d'amorces, il est recommandé de diminuer la concentration en Mg^{2+} ; cela diminue l'activité de Taq mais augmente sa spécificité (Ampliqon n.d.). L'ajout d'une polymérase HotStart (plutôt que Taq) à ce mélange permettrait également de diminuer la dimérisation des amorces *telg* et *telc*. En effet, les amorces sont conçues pour avoir une faible complémentarité et s'hybrident donc seulement à basses températures, auxquelles les polymérases Taq peuvent avoir une activité, résultant donc en l'amplification du dimère d'amorces. Une polymérase HotStart, quant à elle, n'est active qu'à haute température. Son utilisation n'empêche pas la formation des dimères, mais elle diminue l'amplification de tels produits (England Biolabs n.d.). Cependant, pour des raisons évidentes de rapidité et de facilité de la méthode, nous avons plutôt opté pour l'utilisation d'un mélange déjà préparé, contenu dans le kit évoqué ci-dessus. Les composantes du mélange ne sont donc pas modifiables. Néanmoins, quatre composés peuvent y être ajoutés pour diminuer la dimérisation des amorces télomériques : le DMSO, la BSA, la bêtaïne et le formamide. Il s'agit de quatre activateurs de PCR ; ils augmentent la spécificité de la polymérase et réduisent ainsi l'amplification de produits aspécifiques (Sarkar et al. 1990 ; Promega n.d. ; Kreader 1996). Finalement, si aucune de ces solutions ne permet d'éliminer le problème de dimérisation, il faudra envisager de changer ou de redessiner les amorces télomériques. Comme nous l'avons évoqué dans une section précédente, le test « Mesure de l'activité de la télomérase » utilise la PCR pour amplifier une séquence télomérique. Dans ce test, les amorces sont biotinylées en 5' afin de permettre leur immobilisation sur une plaque fixée à la streptavidine. Selon le fournisseur, la présence de biotine empêcherait les amorces télomériques de dimériser (Roche Life Science n.d.). Nous pourrions donc envisager de rajouter une molécule de biotine à l'extrémité 5' des amorces *telg* et *telc*.

Le deuxième problème mis en évidence par l'utilisation de la méthode *singleplex* est un décalage d'environ 4 cycles pour l'amplification de la séquence du gène de l'albumine, entre l'ADN extrait et l'ADN génomique pur. Le nombre de copies de ce gène étant théoriquement identique relativement à la quantité d'ADN pour ces deux échantillons, c'est l'efficacité de l'extraction d'ADN qui a été mise en cause. Le protocole d'extraction d'ADN a ainsi été optimisé par l'ajout d'un traitement RNase et utilisation d'un million de cellules. Cela a permis au décalage des Cp d'être totalement éliminé.

La seconde étape du développement du test « Mesure de la longueur des télomères » a consisté au passage en *multiplex*, tout en tenant compte des modifications apportées lors de l'optimisation de la phase *singleplex*. Cependant, les premières expériences ont révélé que la mise en présence des amorces *telg*, *telc* et *albd* faisait apparaître un produit d'amplification inattendu, probablement causé par la dimérisation de l'amorce *albd* avec l'amorce *telg* ou *telc*. Pour cette raison, la méthode de qPCR *multiplex* a été abandonnée. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, l'utilisation du *multiplex* est indispensable dans le cadre de la commercialisation de tests de diagnostic *in vitro*. Des développements supplémentaires seraient donc nécessaires. Ils consisteraient à analyser d'autres gènes de référence, dont le nombre de copies dans le génome humain est connu et constant (dans le but de calculer un rapport, similaire au ratio T/S), et/ou à diminuer la longueur de la GC (peut être à l'origine du problème de dimérisation).

Finalement, le ratio T/S a été calculé pour chaque passage d'une culture long terme de trois lots C-Cure®, et ce en utilisant la qPCR *singleplex* optimisée. Il a été observé que la longueur relative des télomères pour deux de ces lots est stable, alors qu'elle a tendance à augmenter durant les derniers passages de la culture du lot C-Cure® 1. La signification de ce résultat, opposé à la théorie, a rapidement été remise en question suite à l'observation que le Cp du gène de l'albumine n'est pas stable tout au long de la culture long terme. Pour expliquer cette anomalie, nous avons formulé l'hypothèse d'une diminution qualitative et/ou quantitative de l'ADN extrait à partir de ce lot au fur et à mesure des passages de la culture long terme. Les amplifications des télomères et du gène codant pour l'albumine n'évoluent donc pas de la même manière au cours de la culture long terme. Dans ce cadre, il serait intéressant de répéter l'expérience en utilisant d'autres gènes mono-copies, afin de voir si la même tendance est observée. Si le problème venait à persister, cela remettrait en cause la faisabilité de cette méthode analytique, étant donné que le signal « télomères » ne pourrait pas être rapporté à une référence, l'amplification de celle-ci fluctuant de manière non parallèle au signal télomérique.

Bien qu'elle n'ait pas été évaluée lors du développement de ce test, la question de la sensibilité de la mesure de la longueur des télomères peut également être posée. En effet, il est probable que la stabilisation du ratio T/S observée pour les lots C-Cure® 2 et 3 soit causée par un manque de sensibilité du test de qPCR. Si l'on estime que les télomères se raccourcissent de 30 pb à chaque division et qu'une population cellulaire réalise en moyenne 15 doublements en culture long terme, la différence de longueur des télomères entre le premier et le dernier passage sera de 450 pb. Sachant que les télomères ont en moyenne une longueur initiale de 11 kb (2-20 kb), il est fort probable que la réaction de qPCR et le calcul du ratio T/S ne permettent pas de voir la suppression de 450 pb, qui ne représente que 4,1% de la longueur totale du télomère. Comme nous le voyons, la sensibilité de la méthode dépend donc de la longueur initiale du télomère. En effet, plus celle-ci est faible, plus il sera aisé d'observer la suppression de 450 pb. Pour illustration, il est plus facile de détecter la suppression de 450 pb sur une longueur totale de 2 kb (22,5%) que la suppression de ce même nombre de paires de bases sur une longueur totale de 20 kb (2,25%).

Au vu des difficultés rencontrées pour corrélérer l'évolution de la longueur des télomères avec un ralentissement de prolifération en culture long terme, il est indispensable d'envisager un usage alternatif du test « Mesure de la longueur des télomères ». De plus, l'utilisation de la culture long terme impose une durée assez conséquente à ce test de mesure de la longueur des télomères, ce qui est peu compatible avec la création d'un test de *release*. Nous avons donc envisagé deux possibilités de développement futur.

Tout d'abord, ce test pourrait être utilisé pour s'émanciper de la culture long terme. Il consisterait à se baser sur le ratio T/S à P3 (dernier passage de C-Cure®) pour prédire le cPD qui serait obtenu si cette population cellulaire était mise en culture. Pour cela, les données de culture long terme de 42 lots C-Cure® sont disponibles. Ainsi, la prédiction du cPD nous permettrait de déterminer si un échantillon cellulaire dépasse la limite de Hayflick (50 cPD). Si c'est le cas, il est potentiellement tumoral. Le développement de ce test pourrait cependant être compromis par le matériel cellulaire utilisé. En effet, dans le cadre de C-Cure®, chaque échantillon cellulaire testé provient d'un patient différent. En fonction de l'âge du patient ou des facteurs environnementaux auxquels il a été exposé, les cellules peuvent avoir des télomères de longueur initiale plus ou moins grande. A cause de la variabilité inhérente à la thérapie cellulaire autologue, construire une équation de prédiction du cPD pourrait donc s'avérer complexe voire impossible.

La deuxième utilisation qui pourrait être faite du test « Mesure de la longueur des

télomères » serait un test d'identification des cellules ALT-positives. Comme évoqué dans l'introduction, les cellules tumorales utilisant le mécanisme ALT peuvent être identifiées par une série de caractéristiques phénotypiques, dont une longueur totale des télomères plus élevée. Théoriquement, le ratio T/S devrait donc être plus élevé dans ces cellules, comparativement aux cellules issues du procédé de C-Cure®. Cependant, la longueur moyenne des télomères dans des lignées cellulaires ALT n'a pas été clairement déterminée. Nous ne pouvons donc pas écarter la probabilité que celle-ci ne soit pas suffisamment élevée pour observer une différence avec les échantillons C-Cure®, surtout eu égard au potentiel problème de sensibilité de la technique.

VI Conclusion

Ce mémoire avait pour objectif de développer et/ou valider plusieurs méthodes analytiques afin de confirmer l'absence de potentiel tumorigène (et donc de permettre sa libération d'un point de vue sécurité) dans les échantillons de C-Cure®, thérapie cellulaire autologue régénératrice de tissu myocardique infarci. En effet, des méthodes alternatives ou complémentaires au caryotype, actuellement utilisé par l'industrie dans ce même but, sont nécessaires. Tous les tests développés dans le cadre de ce mémoire sont des tests limites, c'est-à-dire qu'ils sont des tests de détection des impuretés et dont le résultat est binaire (positif/négatif). Pour qu'un test limite soit valide, sa spécificité et sensibilité doivent au minimum être analysées.

La conclusion liée au premier test étudié dans ce mémoire, le test de culture en « Soft agar », se trouve dans l'Annexe 1.

Les quatre méthodes principales développées dans le cadre de ce mémoire académique se basent sur une caractéristique universellement acquise par les cellules tumorales : l'immortalité répliquative. Elles ont été étudiées dans le but de répondre aux objectifs de ce mémoire, qui sont de créer des tests qui sont suffisamment fiables que pour pouvoir être utilisés seuls pour confirmer ou infirmer l'absence de potentiel tumorigène dans les échantillons de C-Cure®. Les deux premiers tests de cet ensemble concernent le mécanisme d'allongement des télomères le plus prévalent dans les tumeurs – la télomérase hTERT – et consistent en :

- une mesure de l'expression du gène de la télomérase par RT-qPCR. Ce mémoire a notamment permis de valider la spécificité et la sensibilité (1% MG-63) de ce test ;
- une mesure de l'activité de la télomérase par PCR et ELISA. Dans le cadre de ce mémoire, le développement de ce test a été réalisé. Ainsi, il a été déterminé que ce test est spécifique et qu'il a une sensibilité en moyenne 4,4 fois supérieure au caryotype. L'analyse de la précision a montré un résultat mitigé, qui pourrait être dû à l'accumulation successive de variabilité de la PCR et de l'ELISA. Pour améliorer ce paramètre, nous pouvons envisager de combiner l'amplification et la quantification de la séquence télomérique en utilisant la technique de qPCR.

Le troisième test développé s'intéresse à l'autre mécanisme d'allongement des télomères puisqu'il consiste à détecter, par la technique d'ASB-qPCR, une série de mutations ponctuelles hautement corrélées avec l'apparition du phénotype ALT. Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à développer le test pour le criblage de deux mutations ponctuelles du gène *TP53* (R273H et R273C). Les développements réalisés

ont ainsi permis de sélectionner le jeu d'amorces/sonde qui présentait les résultats les plus encourageants en termes de spécificité, l'utilisation d'un jeu ou l'autre n'ayant pas d'impact sur la sensibilité du test. Pour ces mutations, nous avons choisi de travailler avec le deuxième jeu, qui correspond à des températures de dissociation plus élevées de l'amorce sens WT, de l'amorce anti-sens et de la sonde. En ce qui concerne la sensibilité du test, nous avons déterminé que la limite de détection est de 1% de copies mutées pour la mutation R273H et est inférieure à 10% de copies mutées pour la mutation R273C. Des expériences supplémentaires devront être réalisées afin d'appuyer l'évaluation de la sensibilité du test.

Plutôt que de concerner les mécanismes moléculaires se situant en amont de l'activation de l'immortalité répliquative, le dernier test de tumorigénicité étudié s'intéresse à leurs conséquences : le maintien de la longueur des télomères. Ainsi, une technique connue de qPCR *multiplex* a été utilisée pour calculer la longueur relative des télomères, dans le but d'observer son évolution au fur et à mesure des passages d'une culture sur le long terme. L'utilisation du *multiplex* s'étant révélée problématique suite à l'observation que l'amorce *albd* dimérise avec un ou deux amorces télomériques, la technique a été utilisée et optimisée en *singleplex*. Ainsi, la diminution des concentrations de *telg* (100 nM) et *telc* (500 nM) a permis de diminuer le signal de dimérisation à 2,02% du signal total. L'extraction d'ADN a également été optimisée (par ajout de RNase A et utilisation d'1 million de cellules), ce qui a permis de supprimer l'écart de Cp observé entre l'ADN extrait et l'ADN génomique pur de référence pour l'amplification de la séquence codant pour l'albumine. L'utilisation de la qPCR *singleplex* n'a pas été concluante pour l'analyse de l'évolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des divisions, probablement à cause d'une dégradation du matériel désoxyribonucléique au cours du temps mais également d'un manque de sensibilité de la méthode. D'autres pistes pour l'utilisation de la mesure de la longueur des télomères sont cependant envisageables et peuvent être développées à court terme.

En résumé, au cours de ce mémoire, nous avons validé un test (« Mesure de l'expression de *hTERT* ») et développé quatre autres tests. Parmi ceux-ci, deux ont montré des résultats largement encourageants sur le plan de la spécificité et de la sensibilité (« Mesure de l'activité de la télomérase » et « Détection des mutations ALT »). Dans le cadre d'un développement pour *Celyad*, les deux derniers tests ont été abandonnés, par manque de sensibilité pour le « Soft agar » et par échec du concept initial pour le test « Mesure de la longueur des télomères ».

En ce qui concerne les objectifs définis pour ce mémoire, nous pouvons affirmer qu'ils sont remplis pour les trois tests pour lesquels les résultats étaient concluants. En

effet, ils sont fiables et pertinents, car rendent compte de l'immortalité répliquative, un marqueur universel du cancer et une étape inévitable du processus de tumorigenèse. Individuellement, ces trois tests ne permettent pas de garantir que les échantillons de C-Cure® sont exempts de cellules à caractère tumoral. Par contre, leur pertinence repose sur la haute complémentarité de ces méthodes analytiques. En effet, leur utilisation coordonnée permet de couvrir tous les mécanismes connus d'allongement des télomères et nous assure *a priori* de fournir un résultat complet pour infirmer ou confirmer la tumorigénicité des lots de thérapie cellulaire. Le deuxième critère est également rempli pour ces trois tests, puisqu'ils possèdent une sensibilité allant de 0,1% à 1% (en fonction du test et du type de cellules tumorales utilisé), ce qui est de 10 à 100 fois supérieur à la sensibilité du test caryotype. La partie scientifique de ce mémoire a donc permis de développer trois tests spécifiques, plus sensibles que le caryotype, complémentaires, fiables et pertinents.

VII Annexes

ANNEXE 1

Développement du test « Soft agar »

I. Introduction : la croissance indépendante de l'ancrage

La croissance indépendante de l'ancrage est une capacité acquise de certaines cellules tumorales à croître dans des environnements nouveaux, avec un attachement limité à la matrice extracellulaire, et qui peut être évaluée en caractérisant leur aptitude à former des colonies dans un milieu semi-solide. De nombreuses études ont fait le lien entre cette caractéristique et l'agressivité d'une tumeur *in vivo* (potentiels tumorigène et métastatique), ce qui fait de la croissance indépendante de l'ancrage un marqueur fondamental en biologie du cancer (Mori et al. 2009).

La croissance indépendante de l'ancrage est caractéristique tumorale qui se développe suite à la résistance des cellules au phénomène d'anoïkisie. L'anoïkisie est une forme d'apoptose induite par le détachement cellulaire qui a pour but d'éliminer les cellules dont la position ou la localisation est mauvaise. Pour échapper à ce phénomène, les cellules tumorales ont adapté trois types de stratégies (Figure 24) (Guadamillas et al. 2011) :

- S'adapter au nouvel environnement. La première façon pour les cellules tumorales de s'adapter à leur environnement est d'acquérir un phénotype similaire à celui de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Au cours de ce processus, les cellules se détachent les unes des autres et sont partiellement dédifférenciées ; elles regagnent alors la capacité de proliférer et de migrer. Ce mécanisme implique l'intervention de la voie PI3K-Akt, mais également de facteurs tels que NF- κ B, Snail et Twist, qui ont un rôle primordial dans la promotion de la survie cellulaire. Pour éviter l'anoïkisie en s'adaptant à leur environnement, les cellules peuvent également modifier leur répertoire d'intégrines en réponse à une signalisation oncogénique ou à des pressions micro environnementales. Les intégrines sont des récepteurs de surface qui ont pour fonction d'interagir avec la matrice extracellulaire et de permettre l'adhésion de la cellule (et donc, la croissance dépendante de l'ancrage).
- Contrecarrer les contributions négatives. Pour survivre même en absence de signalisation des intégrines, les cellules peuvent tout d'abord activer de manière constitutive divers signaux stimulateurs de survie comme PI3K, Ras-Erk, NF- κ B

et Rho GTPase. Cette activation peut être réalisée par le biais de la sécrétion autocrine de facteurs de croissance, déclenchant des voies impliquées dans la prolifération, la survie ou la migration cellulaire. Pour contrecarrer l'absence de signaux émanant des intégrines, les cellules tumorales peuvent également empêcher l'internalisation de plateformes signalétiques à la membrane plasmique, telles que les micro-domaines enrichis en cholestérol (CEMMs, pour *Cholesterol-Enriched Membrane Microdomains*) notamment responsables de l'internalisation de Cav1. Bloquer l'internalisation de cette molécule permet de maintenir un niveau élevé de signalisation des voies Ras-MAPK, PI3K-Akt et Rac-PAK, elles-mêmes impliquées dans la prolifération cellulaire.

- Se cacher et attendre. Cette stratégie fait intervenir l'autophagie ou l'entose. L'autophagie est un processus lysosomal d'autodigestion de la cellule. L'entose, quant à elle, est un processus qui implique l'invasion d'une cellule vivante dans le cytoplasme d'une autre cellule. L'issue de ces deux mécanismes est incertaine puisqu'ils ne mènent pas à la mort de la cellule dans tous les cas. Quoi qu'il en soit, ils fournissent une autre échappatoire à l'anoïkisie. En effet, en présence d'une signalisation intégrines faible, le déclenchement de l'autophagie ou de l'entose ferait rentrer la cellule tumorale dans un état dormant. Cela permettrait aux cellules d'éviter l'entrée en apoptose et leur donnerait donc une chance de survivre en réactivant leur métabolisme une fois qu'elles se rattachent à la matrice extracellulaire.

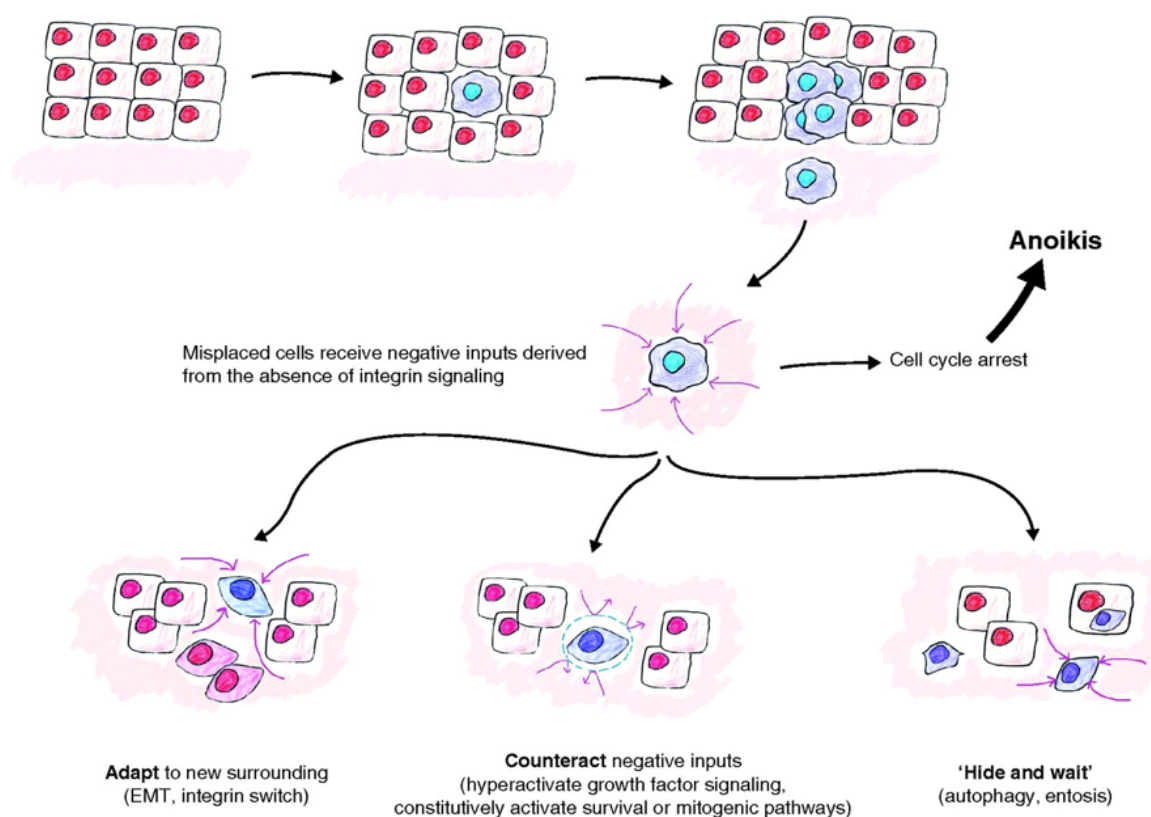


FIGURE 24 – Mécanismes de résistance à l’anoikisie, à l’origine de la croissance indépendante de l’ancrage (Guadamillas et al. 2011).

Une étude menée dans le but de décélérer une signature transcriptomique spécifique à la croissance indépendante de l’ancrage a également permis de mettre en évidence le lien entre l’acquisition de cette propriété et les activités mitochondriales et ribosomales au sein des cellules tumorales. Il a ainsi été montré que le phénotype de croissance indépendante de l’ancrage est corrélé à une augmentation de l’expression de gènes mitochondriaux, principalement ceux impliqués dans la voie des pentoses-phosphate et du cycle de Krebs. Plusieurs gènes ribosomaux sont aussi surexprimés dans ces cellules. Nous pouvons donc postuler que le développement de la croissance indépendante de l’ancrage implique une certaine biogenèse de la mitochondrie et du ribosome (Mori et al. 2009).

II. Principe

La culture en « Soft agar » est une méthode permettant d’évaluer la transformation cellulaire *in vitro* sur base du principe de croissance indépendante à l’ancrage. De manière générale, ce test mesure la prolifération de cellules placées dans un milieu de culture semi-solide après incubation pendant plusieurs jours/semaines, et ce par comptage manuel des colonies ou détection colorimétrique (Borowicz et al. 2014 ; Cell Biolabs n.d.).

De manière plus précise, les détails conceptuels de la technique utilisée dans le cadre de ce mémoire sont présentés à la figure ci-dessous. Le système « Soft agar » utilisé dans ce mémoire consiste en la superposition de deux couches dont la matrice est faite d'Agar : une couche de fond (*Base Layer*), qui contient uniquement la matrice, surmontée par une couche superficielle (*Top Layer*), qui contient à la fois la matrice et un échantillon de suspension cellulaire. Après montage dans un puits ou une boîte de culture, les deux couches sont incubées à 37°C/5% CO₂ pendant 8 jours, période destinée à la prolifération cellulaire. Pendant cette période, seules les cellules ayant acquis la capacité de croissance indépendante de l'ancrage lors du processus de transformation se divisent et forment des colonies. Comme expliqué précédemment, la croissance peut être évaluée par une méthode colorimétrique. Au terme de l'expérience, la matrice d'Agar est donc solubilisée et la prolifération est analysée grâce à l'AlamarBlue®. L'AlamarBlue® est un indicateur redox permettant d'évaluer la fonction métabolique cellulaire. Sa forme oxydée a une coloration bleue et absorbe la lumière à 600 nm ; sa forme réduite a une coloration rose/rouge et absorbe la lumière à 570 nm. Sur cette base, il est utilisé pour quantifier la croissance cellulaire après 8 jours dans le système de culture « Soft agar » (Rampersad 2012 ; Hamid et al. 2004 ; Biosource 2009). En effet, une fois absorbé, l'AlamarBlue® est réduit par les cellules métaboliquement actives. Le pourcentage d'AlamarBlue® réduit est directement proportionnel à la quantité et à l'activité métabolique des cellules présentes dans le système (Biosource 2009). En résumé, en évaluant la croissance cellulaire dans un système où seules les cellules transformées peuvent proliférer, la technique « Soft agar »/AlamarBlue® permet donc de déterminer la quantité de cellules tumorales présentes au départ dans un échantillon.

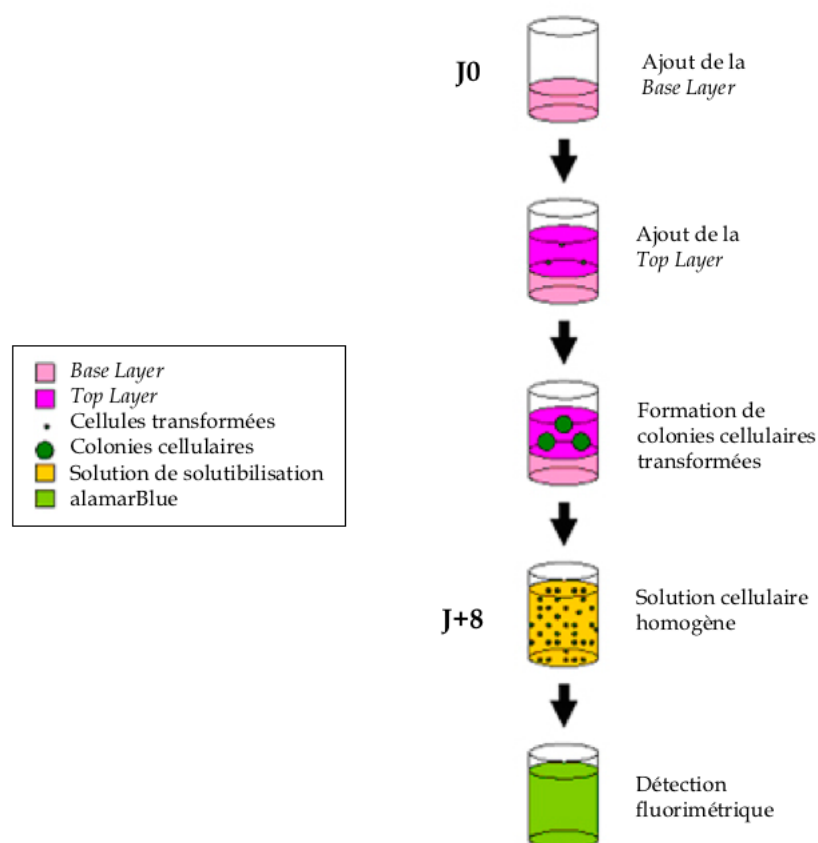


FIGURE 25 – Principe du test « Soft agar » tel qu'utilisé dans ce mémoire (figure retravaillée sur base de (Bioscience 2015)).

III. Matériel et méthodes

III.A. Echantillons contrôles et *spiking*

Deux types d'échantillons contrôles sont pris en compte dans le test « Soft agar » :

- Des cellules HT1080 sont utilisées comme contrôle positif ;
- Des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BMMSCs) sont utilisées comme contrôle négatif car elles ne possèdent pas de propriété de croissance indépendante à l'ancrage (Jung et al. 2012) ;
- Un échantillon ne contenant pas de cellules (ligne de base) est également analysé en guise de contrôle négatif et dans un but de normalisation.

Afin de développer ce test, des échantillons cellulaires contenant différentes proportions de HT1080 ont été préparés par *spiking*. Cette méthode consiste à mettre des cellules tumorales en présence de cellules négatives qui, dans notre cas, sont les BMMSCs et permet donc de traiter des échantillons avec différentes proportions de cellules positives dans un fond cellulaire constant.

III.B. Méthodes

La procédure de culture en « Soft agar » s'étend sur 13 jours et est réalisée comme suit :

- Les échantillons cellulaires utilisés comme contrôles sont décongelés selon la procédure décrite précédemment, et semées à 6 000 cellules/cm² dans une solution SMe/5% hPL. Cette étape a pour but d'activer le métabolisme des cellules après leur période de stockage à très basses températures ;
- Après trois jours dans l'incubateur (37°C/5% CO₂), les cellules sont récoltées et semées à nouveau avec une densité de 11 500 cellules/cm² dans une solution SMe/5% hPL ;
- Le jour suivant, deux plaques 96-puits de « Soft agar » sont réalisées, chaque échantillon étant analysé en triplicat. Pour réaliser les deux couches, on utilise des solutions fournies dans le kit « CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay (Soft Agar Colony Formation) » (Cellbiolabs, #CBA-135).
 - La *Base Layer* se compose de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) 2x/10% hPL (50% v/v), d'eau stérile (40% v/v) et d'Agar 10x (10% v/v). Après sa préparation, 50 µL de *Base Layer* sont ajoutés par puits et les plaques sont mises à 2-8°C pendant 1 heure pour permettre la solidification de la couche basale ;
 - Pendant ce temps, les cellules sont récoltées et les suspensions cellulaires sont diluées pour atteindre une titre final de 1x10⁶ cellules/mL ;
 - La *Top Layer* se compose de DMEM 2x/10% hPL (46,6% v/v), de « *Matrix Diluent* » (36,6% v/v) et d'Agar 10x (10% V/V). Après sa préparation, la *Top Layer* est mélangée à la suspension cellulaire diluée (ratio 14 :1 v/v) et 75 µL de ce mélange sont ajoutés par puits. Les plaques sont incubées à 2-8°C pendant 1 heure pour permettre la solidification de la couche supérieure ;
 - Cinquante microlitres de SMe/5% hPL sont ajoutés à chaque puits.

Une plaque (J0, niveau basal) est ensuite directement soumise à la quantification par alamarBlue®. La seconde plaque (J+8) est incubée à 37°C/5% CO₂ pendant 8 jours (avec, après 4 jours, l'ajout de 50 µL de SMe/5% hPL à chaque puits) et soumise au test alamarBlue® après cette période. L'analyse alamarBlue® consiste en la procédure suivante :

- Ajouter 125 µL de la solution de solubilisation 1x à chaque puits ;
- Homogénéiser chaque puits et en transférer 100 µL dans une plaque 96-puits ;
- Incuber à 37°C/5% CO₂ pendant 4 heures ;

- Placer la plaque dans le SpectraMax 190 Microplate Reader (*Molecular Devices*) et en lire l'absorbance à 570 nm et à 600 nm.

Chaque puits est donc caractérisé par deux valeurs d'absorbance, utilisées pour calculer le pourcentage d'alarmarBlue® réduit par un échantillon cellulaire donné. Pour obtenir cette valeur, il faut d'abord calculer les concentrations des formes réduite et oxydée d'alarmarBlue® dans le puits. Pour cela, les deux formules suivantes sont utilisées :

$$A(570) = \epsilon_{ox}(570)C_{ox} + \epsilon_{red}(570)C_{red}$$

$$A(600) = \epsilon_{ox}(600)C_{ox} + \epsilon_{red}(600)C_{red}$$

où,

C_{red} : concentration de forme réduite d'alarmarBlue® ;

C_{ox} : concentration de forme oxydée d'alarmarBlue® ;

$\epsilon_{red}(570)$: coefficient d'extinction molaire de la forme réduite d'alarmarBlue® à 570 nm ;

$\epsilon_{red}(600)$: coefficient d'extinction molaire de la forme réduite d'alarmarBlue® à 600 nm ;

$\epsilon_{ox}(570)$: coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée d'alarmarBlue® à 570 nm ;

$\epsilon_{ox}(600)$: coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée d'alarmarBlue® à 600 nm ;

$A(570)$: absorbance mesurée à 570 nm ;

$A(600)$: absorbance mesurée à 600 nm.

Ces équations sont transformées, pour obtenir la concentration respective des formes réduite et oxydée d'alarmarBlue® :

$$C_{red} = \frac{\epsilon_{ox}(600) \times A(570) - \epsilon_{ox}(570) \times A(600)}{\epsilon_{red}(570) \times \epsilon_{ox}(600) - \epsilon_{ox}(570) \times \epsilon_{red}(570)}$$

$$C_{ox} = \frac{\epsilon_{red}(570) \times A(600) - \epsilon_{red}(600) \times A(570)}{\epsilon_{red}(570) \times \epsilon_{ox}(600) - \epsilon_{ox}(570) \times \epsilon_{red}(570)}$$

Ces deux formules nous permettent de calculer le pourcentage d'alarmarBlue® réduit :

$$\% \text{ alarmarBlue® réduit} = \left(\frac{C_{red} \text{ échantillon}}{C_{red} \text{ baseline}} \right) \times 100$$

La valeur obtenue pour la *baseline* est finalement soustraite à la valeur obtenue pour chaque échantillon, afin d'analyser la métabolisation de l'AlamarBlue® propre aux cellules.

Ce raisonnement est utilisé pour calculer le pourcentage d'AlamarBlue® réduit par le même échantillon, dans la plaque J0 et dans la plaque J+8. Finalement, pour observer une possible évolution de croissance des cellules après 8 jours d'incubation, on calcule un Δ (représentant l'évolution de signal entre J0 et J+8) par la formule suivante :

$$\Delta = \% \text{ AlamarBlue® réduit à J+8} - \% \text{ AlamarBlue® réduit à J0}$$

IV. Développement et optimisation de la méthode

Avant la réalisation de ce mémoire, une première phase d'optimisation du test « Soft agar » avait été achevée par les équipes de *Celyad*. Il a ainsi été décidé que cette méthode serait utilisée en test limite. Le but de la phase ultérieure de développement du test « Soft agar » est donc d'évaluer la spécificité et la sensibilité, ainsi que la précision de la méthode (bien que celle-ci ne soit pas indispensable à la création d'un test limite).

IV.A. Spécificité

Pour déterminer si le test « Soft agar » est spécifique, trois types d'échantillons ont été analysés :

- La ligne de base, qui consiste à ne mettre aucune cellule dans la couche supérieure du système « Soft Agar » ;
- Les cellules souches mésenchymateuses naïves (BMMSCs) ;
- La lignée tumorale HT1080.

L'analyse de la prolifération cellulaire est effectuée via le calcul d'un indice Δ , qui représente la différence de pourcentage d'AlamarBlue® réduit entre le jour du semis des cellules dans le système bi-couche (J0) et le dernier jour de l'expérience, c'est-à-dire après 8 jours d'incubation (J+8).

Au vu des résultats observés à la Figure 26, le principe théorique de la méthode de culture en « Soft agar » est vérifié, puisque les cellules tumorales HT1080 montrent bien une prolifération après 8 jours d'incubation dans le système bicouche ($\Delta = 49,63\%$). Les BMMSCs, quant à elles, ne montrent pas de prolifération et un différentiel Δ de -0,2% témoigne même d'une légère perte de signal, qui être probablement causée par la mort de certaines cellules entre la mesure à J0 et à J+8. La ligne de base montre

également un signal inchangé entre J0 et J+8. Cependant, les données reprises à la Figure 26 permettent de mettre en évidence l'important bruit de fond généré par les composants des couches elles-mêmes. En effet, la méthode colorimétrique estime qu'environ 15% d'AlamarBlue® est réduit en absence de cellules dans la *Top Layer*. On peut donc conclure que, bien que l'AlamarBlue® soit préférentiellement métabolisé au sein de cellules vivantes, une certaine proportion de cette molécule est potentiellement réduite par certains composants du milieu et/ou de la solution de solubilisation. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier l'absorbance de l'AlamarBlue® dans ces solutions. Une autre possibilité pour expliquer ce signal de base élevé est que la solution d'AlamarBlue® contient initialement une part d'AlamarBlue® réduit.

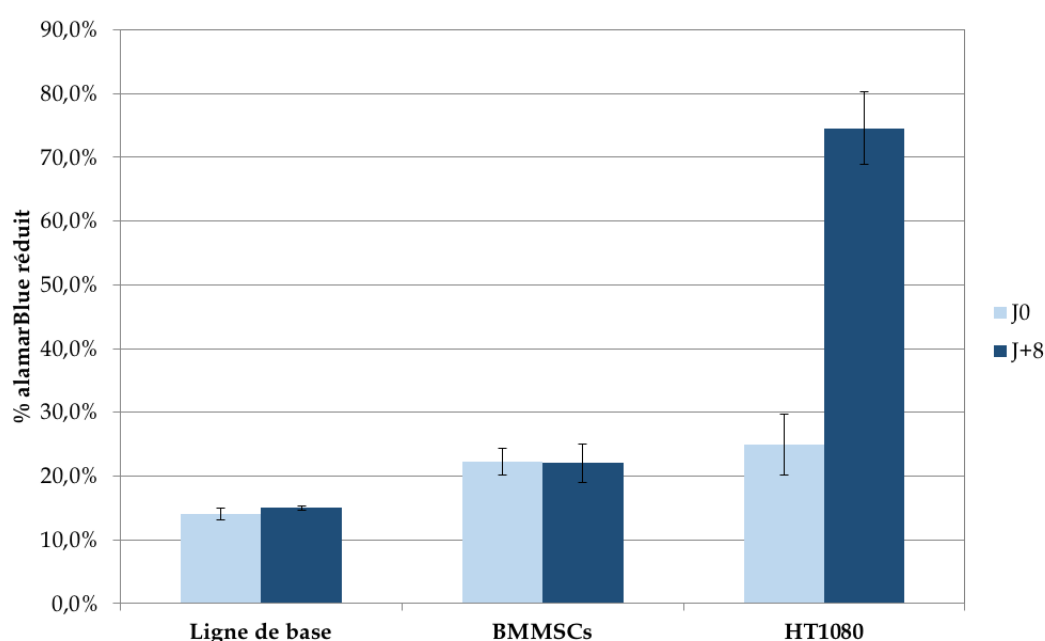


FIGURE 26 – Spécificité du test « Soft agar », montrant le pourcentage d'AlamarBlue® réduit (non normalisé par la ligne de base) obtenu à J0 et après 8 jours d'incubation du système bicouche (J+8).

IV.B. Précision

IV.B.1. Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité du test « Soft agar », un échantillon de BMMSCs et un échantillon de HT1080 ont chacun été testés en sixplicats au sein des plaques 96-puits destinées aux analyses J0 et J+8. Le résultat, exprimé en pourcentage d'AlamarBlue® réduit, est présenté ci-dessous (Tableau 36, Figure 27). Pour ce test, puisque les résultats sont exprimés en pourcentages, la déviation standard (SD) des données servira de référence et la limite de 20% lui sera appliquée.

La répétabilité du « Soft agar » est acceptable, puisque toutes les valeurs de SD sont inférieures à 20%.

Tableau 36 – Répétabilité du test « Soft agar ». Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures à la SD limite de 20%.

ECHANTILLON	J0		J+8		Δ	
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD
HT1080	8,47%	2,98%	44,22%	5,29%	35,75%	5,43%
BMMSCs	9,39%	5,31%	6,94%	2,71%	-2,45%	4,61%

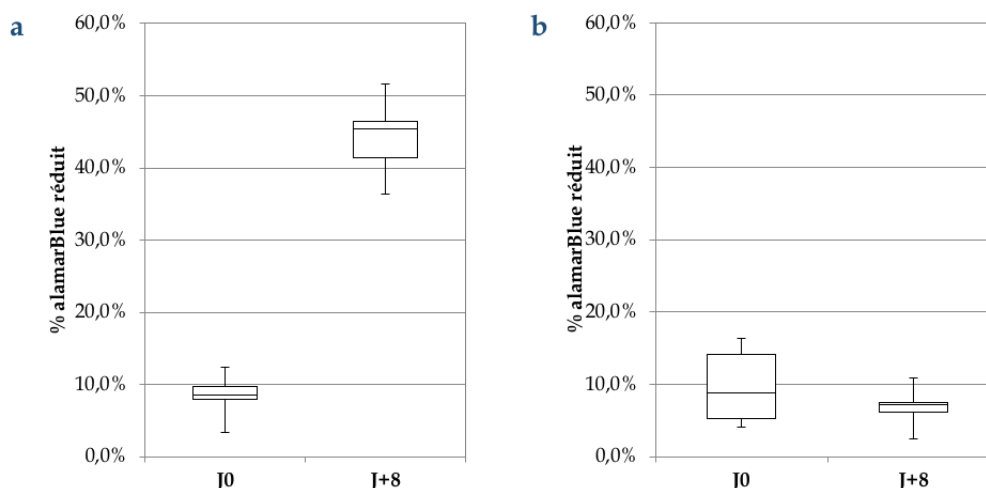


FIGURE 27 – Répétabilité du test « Soft agar ». Boxplot montrant la distribution des valeurs obtenues pour six triplicats au sein d’une même expérience, à J0 et à J+8. Les valeurs d’alamarBlue® réduit sont ici normalisées par la ligne de base. a, boxplot pour les HT1080. b, boxplot pour les BMMSCs.

IV.B.2. Précision intermédiaire

Pour évaluer la précision intermédiaire du test de culture en « Soft agar », un échantillon de BMMSCs et un échantillon de HT1080 ont chacun été testés en triplicat dans 13 expériences différentes. Le résultat, exprimé en pourcentage d’alamarBlue® réduit, est présenté ci-dessous (Tableau 37, Figure 28).

Tableau 37 – Précision intermédiaire du test « Soft agar ». Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont celles inférieures à la SD limite de 20%.

ECHANTILLON	J0		J+8		Δ	
	Moy	SD	Moy	SD	Moy	SD
HT1080	11,55%	3,66%	45,01%	11,82%	33,46%	12,67%
BMMSCs	10,16%	2,80%	7,23%	3,86%	-2,92%	5,25%

L’évaluation de la précision intermédiaire par le calcul de la déviation standard révèle des valeurs inférieures à 20% et légèrement supérieures à celles de la répétabilité, ce qui témoigne d’une plus grande variabilité *inter-run* qu’*intra-run*.

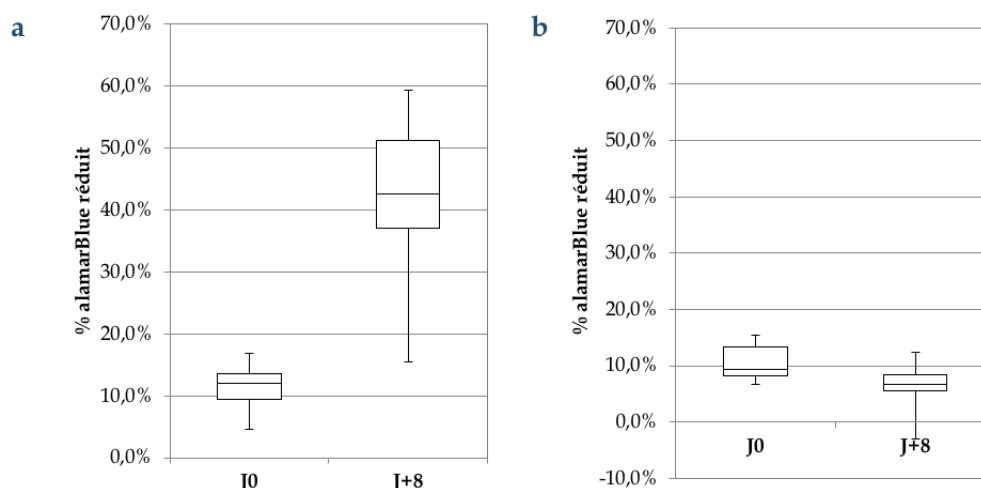


FIGURE 28 – Précision intermédiaire du test « Soft agar ». Boxplot montrant la distribution des valeurs obtenues pour six triplicats au sein d’une même expérience, à J0 et à J+8. Les valeurs d’alamarBlue® réduit sont ici normalisées par la ligne de base. a, boxplot pour les HT1080. b, boxplot pour les BMMSCs.

IV.C. Sensibilité

Comme nous l’avons déjà évoqué, il existe plusieurs manières de calculer la LOD d’une méthode analytique. Dans le cas du « Soft agar », une première approche aurait consisté à appliquer un rapport de 3 ou 2 :1 par rapport à la ligne de base. Cependant, la variabilité de la méthode étant relativement élevée (même si acceptable), il est préférable d’utiliser un calcul tenant compte de ce facteur. Nous avons donc choisi d’utiliser la méthode basée sur la déviation standard du contrôle négatif, représenté par les cellules souches mésenchymateuses.

Afin de déterminer l’augmentation minimale de signal entre J0 et J+8 nécessaire à la détection de cellules transformées, la LOD a été calculée en termes de différentiel Δ par la formule suivante (Armbruster & Pry 2008) :

$$\text{LOD} = (\text{Moyenne BMMSCs}) + 3,3 \times (\text{SD BMMSCs}) = -2,92 + 3,3 \times 5,25 = 14,41\%$$

Afin de tenir compte de la plus grande variabilité possible du test, nous avons utilisé les valeurs de la précision intermédiaire (Tableau 36) pour calculer la LOD.

Nous obtenons donc une limite de détection en termes de différentiel Δ qui équivaut à 14,41% d’augmentation de signal entre J0 et J+8. Une fois ce résultat obtenu, il convient de le convertir en pourcentage de cellules tumorales HT1080. Pour cela, différentes proportions de HT1080 *spikées* ont été soumises au test, et leur différentiel Δ a été calculé (Figure 29). Pour définir la limite de détection en termes de HT1080, tous les échantillons de la proportion considérée doivent avoir un Δ inférieur à 14,41%.

Comme la Figure 29 le montre, un différentiel Δ de 14,41% correspond à la présence de 5% de HT1080 dans l’échantillon (et donc à 250 cellules HT1080, puisque le fond

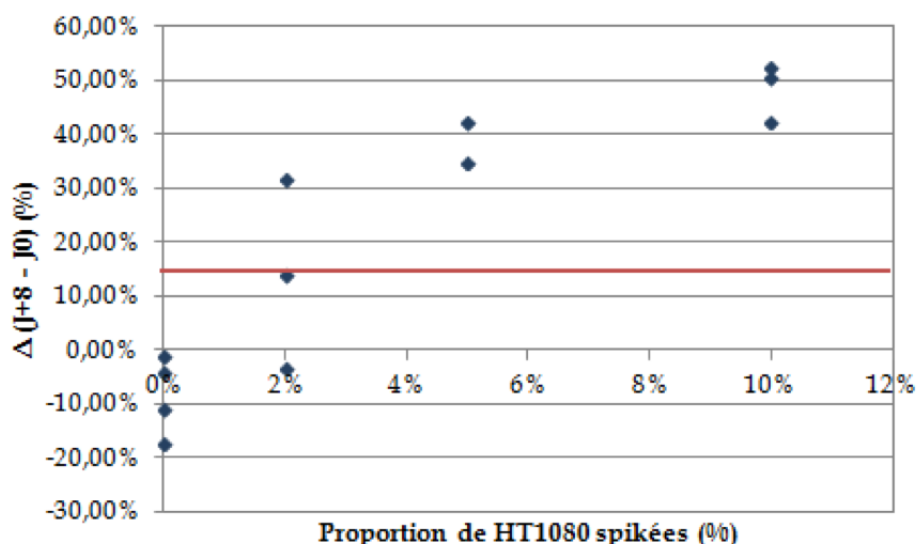


FIGURE 29 – Sensibilité du test « Soft agar » en termes de HT1080. La ligne rouge représente la LOD en termes de Δ (14,41%).

cellulaire est de 5 000 cellules). Il est intéressant de mentionner que la présence d'un différentiel Δ négatif pour l'échantillon *spiké* correspondant à 0% de HT1080 (et donc à 100% de BMMSCs) témoigne d'une diminution du signal entre J0 et J+8, probablement causée par la mort des cellules pendant cette période.

La dernière étape de cette section consiste à déterminer la sensibilité du test en utilisant des cellules issues du procédé C-Cure®, ce qui permet d'exprimer la limite de détection en termes de cellules transformées. Pour cela, plusieurs quantités de cellules préparées par la procédure C-Cure® ont été semées dans une plaque 96-puits (7 500, 10 000, 15 000 et 20 000 cellules par puits). Ces quantités cellulaires sont destinées à mimer l'effet prolifératif observé après 8 jours d'incubation à partir du semis initial de 5 000 cellules à J0. *In fine*, cette expérience nous permettra de déterminer la quantité de cellules qui doit être présente dans chaque puits à J+8 pour considérer que l'échantillon contient des cellules C-Cure® transformées. Pour chaque échantillon, un différentiel Δ a ici été calculé en soustrayant le signal alamarBlue® obtenu pour 5 000 cellules (quantité semée à J0, prévue dans le protocole complet du test) au signal obtenu pour 7 500, 10 000, 15 000 ou 20 000 cellules (quantité théoriquement obtenue à J+8).

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la limite de détection du test correspond à un différentiel Δ de 14,41%. Le but de cette expérience est de comparer les différentiels Δ obtenus pour les différentes quantités cellulaires semées et de déterminer si ceux-ci sont supérieurs à cette limite de détection. Comme on peut le voir sur la Figure 30, un différentiel Δ de 14,41% correspond à la densité de 20 000 cellules C-Cure® par

puits. Cela signifie qu'après 8 jours dans le système « Soft agar », la quantité initiale de 5 000 cellules devrait quadrupler pour qu'un signal soit détectable. Si l'on considère des cellules ayant un temps de doublement de 2 jours (valeur classique, si l'on ne tient pas compte d'un avantage de croissance), celles-ci peuvent théoriquement réaliser trois doublements en 8 jours (temps d'incubation du système). Nous pouvons affirmer ceci par la formule suivante :

$$\text{Nombre de doublements} = \log_{\text{PDT}}(\text{jours d'incubation}) = \log_2(8) = 3$$

Pour connaître le nombre initial de cellules transformées dans le puits au départ, la formule énoncée ci-dessous est utilisée :

$$\begin{aligned}\text{Nombre initial de cellules transformées} &= \frac{\text{nombre de cellules apparues entre J0 et J+8}}{\text{PDT}^{\text{nombre de doublement}}} \\ &= \frac{(20000 - 5000)}{2^3} = 1875\end{aligned}$$

Pour qu'un signal soit détecté par le test de culture en « Soft agar », 1 875 cellules transformées doivent être initialement présentes dans le puits. Autrement dit, en termes de cellules transformées, la sensibilité du test est de 37,5% (1 875/5 000 cellules).

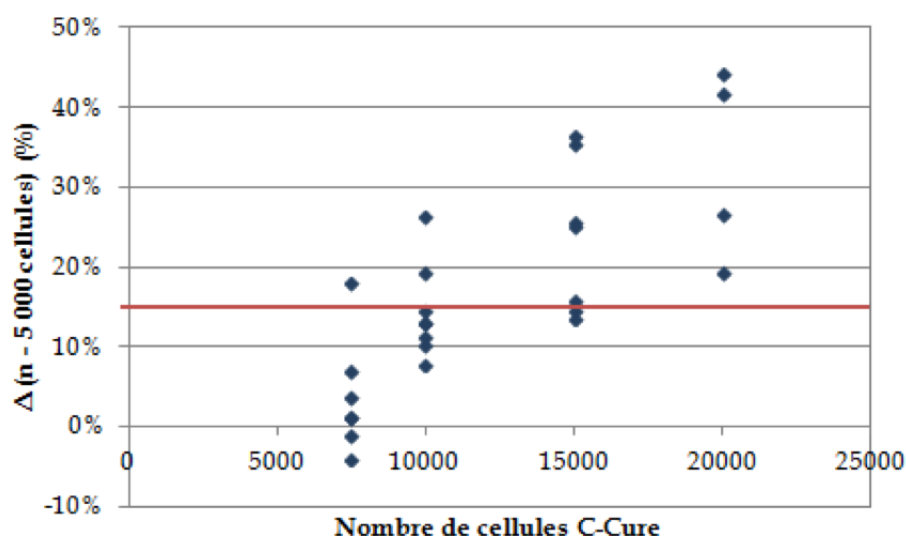


FIGURE 30 – Sensibilité du test « Soft agar » en termes de cellules issues du procédé C-Cure®. Pour chaque quantité cellulaire, plusieurs échantillons différents ont été analysés. La ligne rouge la LOD en termes de Δ (14,41%).

La Figure 30 permet également de mettre en évidence la variabilité métabolique qui existe entre les échantillons C-Cure® issus de patients différents. En effet, la distribution du Δ calculé pour une quantité cellulaire donnée est relativement large ; l'écart maximal entre deux échantillons différents étant de 24,9%.

V. Discussion

La deuxième phase de développement du test « Soft Agar » entamée pendant ce mémoire a permis de déterminer la spécificité, la sensibilité et la précision de cette méthode, établie en tant que test limite.

Ainsi, nous avons déterminé que, malgré un important bruit de fond lié à l'utilisation de l'AlamarBlue®, la technique « Soft agar » est spécifique puisqu'on observe une augmentation de signal prolifératif entre J0 et J+8 pour les HT1080, et pas pour les cellules souches mésenchymateuses naïves.

Cependant, le développement de ce test a été abandonné pour trois raisons principales. Tout d'abord, ce test n'a pas été retenu car se base sur la croissance indépendante de l'ancrage, qui n'est pas un mécanisme universel de tumorigénicité. A la place, il s'agit d'une caractéristique des cellules tumorales invasives (Mori et al. 2009). Le « Soft agar » ne peut donc pas être utilisé seul pour garantir l'absence de potentiel tumorigène au sein des échantillons de C-Cure®. Dans le cadre de ce mémoire, son développement avait été entrepris dans le but de poursuivre un projet entamé par *Celyad*.

Ensuite, la raison principale de l'abandon du test « Soft agar » est sa très faible sensibilité : pour observer un résultat, l'échantillon doit contenir au minimum 37,5% de cellules transformées. Cela est en partie dû à la large distribution des résultats pour les échantillons C-Cure®. On aurait pu considérer qu'un différentiel Δ de 14,41% (LOD) correspond à 10 000 cellules, étant donné que le différentiel Δ moyen pour cette quantité équivaut à 14,5%. Cela aurait résulté en une sensibilité de 12,5% (qui, en somme, restée élevée). Cependant, en tenant compte de cette distribution, on ne peut que choisir de faire correspondre la LOD à 20 000 cellules, puisque c'est la plus petite valeur pour laquelle tous les différentiels Δ sont supérieurs à 14,41%. Quoiqu'il en soit, la sensibilité du test « Soft agar » est donc supérieure à celle du caryotype, et ne présente donc pas de réel avantage par rapport à celui-ci.

Les larges distributions de différentiel Δ , observées tant à la Figure 29 qu'à la Figure 30, peuvent être expliquées par plusieurs hypothèses :

- Elles peuvent être causées par une différence de capacité proliférative entre les échantillons d'un même type cellulaire, suite à une altération partielle lors de la décongélation ou un manque de réactivation lors de la culture antérieure aux tests J0 et J+8. Pour les échantillons de C-Cure®, cela peut également être expliqué par des différences métaboliques entre les cellules de patients différents ;
- Il semble fort probable que la variabilité du test soit principalement le fruit de l'analyse alamarBlue®. Des valeurs écartées de pourcentage d'alamarBlue® réduit sont en effet observées pour un même échantillon contenant théoriquement un nombre constant de cellules ;
- Une dernière possibilité est que le nombre de cellules semées dans chaque plaque ne correspond pas exactement à la quantité fixe de 5 000 cellules. En effet, pour atteindre cette quantité dans le semis, les échantillons cellulaires sont dilués sur base d'un comptage sur hémodécomètre, méthode qui présente elle-même une certaine imprécision (10%).

Finalement, ce test pose problème en ce qui concerne la cohérence des résultats des lots C-Cure®. Comme nous l'avons déjà évoqué, il a été observé que les échantillons de C-Cure® ne présentent pas la même métabolisation de l'alamarBlue® entre eux. Ceci s'explique par le fait que la thérapie développée chez *Celyad* est autologue et que chaque échantillon provient d'un patient différent et contient donc des cellules qui n'ont pas exactement le même métabolisme. De ce fait, il est complexe d'effectuer des comparaisons entre les résultats obtenus pour différents lots C-Cure® et, par là-même, d'établir une référence pour ce test.

Il est également important de souligner que, d'un point de vue conceptuel, le principal désavantage de ce test est sa durée relativement élevée. De la décongélation des échantillons cellulaires à leur incubation pendant 8 jours dans le système « Soft agar », l'ensemble des manipulations sont étendues sur 14 jours. Cette période plus ou moins longue pose problème pour la création d'un test de *release*, qui doit permettre une évaluation rapide de la sécurité du produit de thérapie cellulaire avant son injection chez le patient.

VI. Conclusion

Parallèlement aux réels objectifs de ce mémoire, une étude sur le « Soft agar » a été menée pour achever un projet réalisé chez *Celyad*. Basé sur le principe de croissance indépendante de l'ancrage, il consiste à cultiver des cellules pendant 8 jours dans un milieu semi-solide et à observer leur prolifération par une méthode colorimétrique (alamarBlue®). La deuxième phase de développement entamée pendant ce mémoire a mené à l'abandon de cette méthode, parce qu'il ne répond pas aux objectifs fixés initialement. En effet, sa sensibilité est trop faible (12,5% en moyenne et 37,5% en tenant compte de la distribution). Dans les deux cas, la limite de détection est plus élevée que pour le test caryotype. De plus, la croissance indépendante à l'ancrage n'est pas un marqueur universel du cancer. Mis à part ces deux éléments, nous pouvons également mentionner que la précision (*inter-* et *intra-run*) du test laisse à désirer, puisque la majorité des coefficients de variation sont supérieurs à 20%.

ANNEXE 2
Composition détaillée des milieux

- *CryoStor® CS10*

Tableau 38 – Composition détaillée du CryoStor® CS10 (StemCell Technologies n.d.).

COMPOSANT	QUAN- TITÉ/PROPORTION
DMSO	10%
Sérum	N/A
Protéines	N/A
Produits d'origine animale	N/A

- *Solution de Hartmann*

Tableau 39 – Composition détaillée de la solution de Hartmann (Drug.com 2015).

COMPOSANT	CONCENTRATION (g/L)
Sodium chloride	6,000
Sodium lactate	3,120
Potassium chloride	0,400
Calcium chloride	0,270

- *Phosphate Buffered Saline (PBS)*

Tableau 40 – Composition détaillée du Phosphate Buffered Saline (PBS) (Scientific 2015).

TYPE DE COMPOSANT	COMPOSANT	CONCENTRATION (g/L)
Sels organiques	Potassium Phosphate monobasic	144,000
	Sodium Chloride	9.000,000
	Sodium Phosphate dibasic	795,000

- *Advanced Minimum Essential Medium (AdMEM)*

Tableau 41 – Composition détaillée de l'Advanced Minimum Essential Medium (AdMEM)
(ThermoFisher Scientific 2015).

TYPE DE COMPOSANT	COMPOSANT	CONCENTRATION (g/L)
Acides aminés	Glycine	7,500
	L-Alanine	8,900
	L-Arginine hydrochloride	126,000
	L-Asparagine	13,200
	L-Aspartic acid	13,300
	L-Cystine 2HCl	31,000
	L-Glutamic Acid	14,700
	L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	42,000
	L-Isoleucine	52,000
	L-Leucine	52,000
	L-Lysine hydrochloride	72,500
	L-Methionine	15,000
	L-Phenylalanine	32,000
	L-Proline	11,500
	L-Serine	10,500
	L-Threonine	48,000
	L-Tryptophan	10,000
Vitamines	L-Tyrosine disodium salt dehydrate	52,000
	L-Valine	46,000
	Ascorbic Acid phosphate	2,500
	Choline chloride	1,000
	D-Calcium pantothenate	1,000
	Folic Acid	1,000
	Niacinamide	1,000
	Pyridoxine hydrochloride	1,000
	Riboflavin	0,100
Sels inorganiques	Thiamine hydrochloride	1,000
	i-Inositol	2,000
	Calcium chloride	200,000
	Magnesium Sulfate	97,670
	Potassium Chloride	400,000
	Sodium Bicarbonate	2.200,000
Protéines	Sodium Chloride	6.800,000
	Sodium Phosphate dibasic	140,000
	AlbuMAX® II	400,000
	Human Transferrin (Holo)	7,500
	Insulin Recombinant Full Chain	10,000

Eléments trace	Ammonium Metavanadate	3,000x10 ⁻⁴
	Cupric Sulfate	0,001
	Maganous Chloride	5,000
	Sodium Selenite	0,005
Autres	D-Glucose (Dextrose)	1,000
	Ethanolamine	1,900
	Glutathione (reduced)	1,000
	Phenol Red	10,000
	Sodium Pyruvate	110,000

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*

Tableau 42 – Composition détaillée du *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* (Cell Culture 2011).

TYPE DE COMPOSANT	COMPOSANT	CONCENTRATION (g/L)
Acides aminés	L-Glycine	30,000
	L-Arginine hydrochloride	84,000
	L-Cystine dihydrochloride	62,570
	L-Glutamine	584,000
	L-Histidine hydrochloride monohydrate	42,000
	L-Isoleucine	105,000
	L-Leucine	105,000
	L-Lysine hydrochloride	146,000
	L-Methionine	30,000
	L-Phenylalanine	66,000
	L-Serine	42,000
	L-Threonine	95,000
	L-Tryptophan	16,000
	L-Tyrosine disodium salt	103,790
Vitamines	L-Valine	94,000
	Choline chloride	4,000
	D-Ca-Pantothenate	4,000
	Folic acid	4,000
	Nicotinamide	4,000
	Pyridoxal hydrochloride	4,000
	Riboflavin	0,400
	Thiamine hydrochloride	4,000
	i-Inositol	7,200

Sels inor- ganiques	Calcium chloride dihydrate	265,000
	Ferric nitrate nonahydrate	0,100
	Magnesium sulphate anhydrous	97,720
	Potassium chloride	400,000
	Sodium chloride	6.400,000
Autres	D-Glucose	4.500,000
	Phenol red sodium salt	15,900

ANNEXE 3

Précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase »

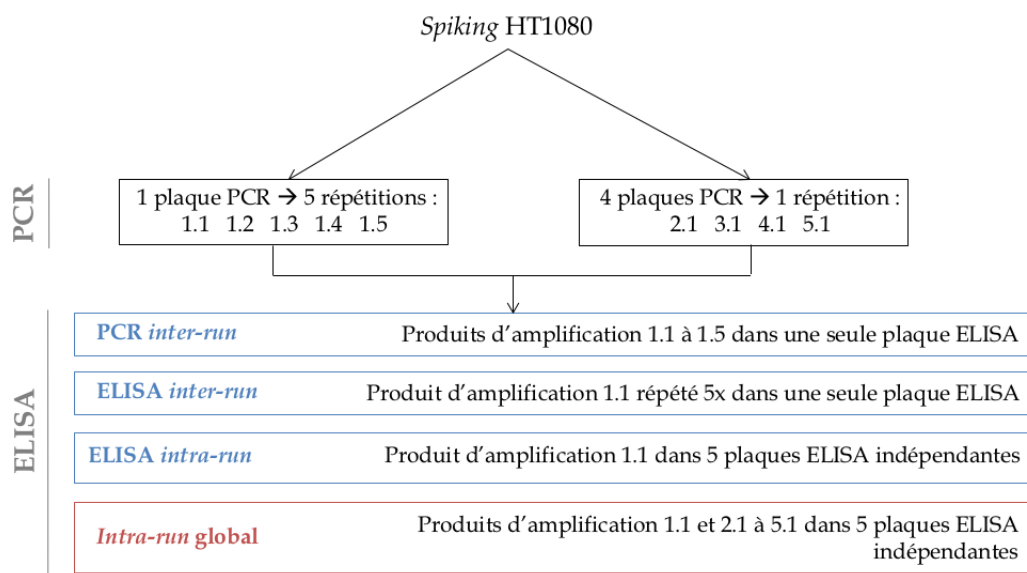


FIGURE 31 – Protocole de l'évaluation de la précision du test « Mesure de l'activité de la télomérase ».

- *PCR inter-run*

Tableau 43 – Résultats de la précision *inter-run* de l'étape PCR du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Prod : produit d'amplification, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé pour les réactions de PCR (3%).

ECHANTILLON	PROPORTION (%)	$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ moyen					Moy	SD	CV
		Prod 1	Prod 2	Prod 3	Prod 4	Prod 5			
HT1080	5,000	1,6002	1,5416	1,4733	1,5229	1,6441	1,5564	0,0668	4,3%
	2,500	1,4600	1,3855	1,3401	1,3403	1,4226	1,4730	0,0523	3,6%
	1,000	1,1696	1,1240	1,0061	1,0668	1,2031	1,2518	0,0791	6,3%
	0,500	1,1164	0,8908	0,8888	1,1146	0,9395	1,0520	0,1163	11,1%
	0,250	0,6429	0,6392	0,6488	0,3284	0,7965	0,8006	0,1714	21,4%
	0,100	0,2419	0,3671	0,4929	0,2785	0,2186	0,4654	0,1120	24,1%
	0,050	0,3827	0,1745	0,2632	0,3978	0,3349	0,3152	0,0924	29,3%
	0,025	0,1212	0,0946	0,1932	0,0613	0,2363	0,2259	0,0720	31,8%
	0,000	0,0732	0,0591	0,0615	0,0598	0,1547	0,1115	0,0412	37,0%
C+	N/A						1,7498	0,1218	7,0%
Solution de lyse	N/A						0,0706	0,0004	0,5%
H ₂ O PCR grade	N/A						0,0872	0,0228	26,1%

- *ELISA inter-run*

Tableau 44 – Résultats de la précision *inter-run* de l'étape ELISA du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Répl : réplicat, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).

ΔOD _(450nm-690nm) moyen											
ECHANTILLON	PROPORTION (%)	RÉPL 1	RÉPL 2	RÉPL 3	RÉPL 4	RÉPL 5	Moy	SD	CV		
HT1080	5,000	1,4947	1,4569	1,3984	1,4849	1,5062	1,4682	0,0431	2,9%		
	2,500	1,3711	1,3702	1,4226	1,5172	1,3911	1,4144	0,0613	4,3%		
	1,000	1,0655	1,0720	1,0592	0,9936	1,0370	1,0454	0,0319	3,0%		
	0,500	0,8615	0,8122	0,7998	0,7988	0,7839	0,8112	0,0298	3,7%		
	0,250	0,7603	0,7534	0,7656	0,7421	0,7083	0,7459	0,0228	3,1%		
	0,100	0,4104	0,3958	0,3823	0,3940	0,3931	0,3951	0,0100	2,5%		
	0,050	0,7123	0,7451	0,7153	0,6998	0,6740	0,7093	0,0258	3,6%		
	0,025	0,2427	0,2338	0,2286	0,2327	0,2239	0,2323	0,0070	3,0%		
	0,000	0,0535	0,0527	0,0547	0,0524	0,0516	0,0530	0,0012	2,2%		
C+	N/A	1,7107							0,0273	1,6%	
Solution de lyse	N/A	0,0549							0,0023	4,3%	
H ₂ O PCR grade	N/A	0,1254							0,0018	1,4%	

- *ELISA intra-run*

Tableau 45 – Résultats de la précision *intra-run* de l'étape ELISA du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Pl : plaque, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).

ECHANTILLON	PROPORTION (%)	$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ moyen							
		Pl 1	Pl 2	Pl 3	Pl 4	Pl 5	Moy	SD	CV
HT1080	5,000	1,6002	2,3904	1,9485	2,3002	2,2049	2,0888	0,3192	15,3%
	2,500	1,4600	2,2448	1,9332	2,1695	2,1748	1,9964	0,3222	16,1%
	1,000	1,1696	1,8024	1,4263	1,5541	1,5619	1,5028	0,2306	15,3%
	0,500	1,1164	1,7395	1,3568	1,5752	1,6307	1,4837	0,2482	16,7%
	0,250	0,6429	0,9657	0,8830	0,7562	0,7414	0,7978	0,1269	15,9%
	0,100	0,2419	0,3140	0,2571	0,2640	0,2490	0,2652	0,0285	10,8%
	0,050	0,3827	0,5386	0,3904	0,4076	0,4052	0,4249	0,0644	15,2%
	0,025	0,1212	0,0787	0,0748	0,0732	0,0815	0,0858	0,0200	23,3%
	0,000	0,0732	0,0863	0,0811	0,0822	0,0858	0,0817	0,0053	6,5%
C+	N/A	1,7498	2,6051	2,4418	2,6110	2,6429	2,4101	0,3774	15,7%
Solution de lyse	N/A	0,0706	0,0797	0,0769	0,0808	0,0860	0,0788	0,0057	7,2%
H ₂ O PCR grade	N/A	0,0872	0,1186	0,1021	0,1099	0,1049	0,1045	0,0115	11,0%

- *Intra-run global*

Tableau 46 – Résultats de la précision *intra-run* globale du test « Mesure de l'activité de la télomérase ». Exp : expérience, Moy : moyenne, N/A : non applicable. Les valeurs en gras sont inférieures au CV limite fixé par les lignes conductrices de l'ICH (20%).

ECHANTILLON	PROPORTION (%)	$\Delta OD_{(450nm-690nm)}$ moyen									
		Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Moy	SD	CV		
HT1080	5,000	1,6002	1,9720	1,7870	2,0318	2,4064	1,9595	0,3016	15,4%		
	2,500	1,4600	2,0085	1,8672	1,8784	2,1002	1,9111	0,2450	12,8%		
	1,000	1,1696	1,9615	1,7297	1,6888	1,9195	1,7783	0,3157	17,8%		
	0,500	1,1164	1,7243	1,6183	1,5716	1,6645	1,6164	0,2429	15,0%		
	0,250	0,6429	1,2369	1,5626	0,8940	1,1445	1,3176	0,3486	26,5%		
	0,100	0,2419	0,7586	1,0836	0,5932	0,8274	0,8985	0,3115	34,7%		
	0,050	0,3827	0,6441	0,8533	0,7676	0,3499	0,6502	0,2258	34,7%		
	0,025	0,1212	0,3310	0,9639	0,0754	0,5777	0,5067	0,3662	72,3%		
	0,000	0,0732	0,0950	0,2385	0,0728	0,1643	0,2713	0,0719	26,5%		
C+	N/A	1,7498	2,2067	1,9993	1,9224	2,2640	1,0786	0,2104	19,5%		
Solution de lyse	N/A	0,0706	0,6580	0,5350	0,5328	0,3422	1,2281	0,2294	18,7%		
H ₂ O PCR grade	N/A	0,0872	0,3292	0,5163	0,0734	0,1740	0,3318	0,1869	56,3%		

ANNEXE 4

Protocole *multiplex* du test « Mesure de la longueur des télomères »

Seules les étapes différant du protocole *singleplex* sont reprises ci-dessous.

Réactions de qPCR

- *Préparation des amorces*

Les amorces sens (*telg*) et anti-sens (*telc*) pour les télomères et les amorces sens (*albd*) et anti-sens (*albu*) pour l'albumine sont commandées chez *Integrated DNA Technologies*. Les amorces *telg* et *telc* sont diluées pour atteindre une concentration respective de 2 μM et 10 μM . Les amorces *albd* et *albu*, quant à elles, sont diluées pour atteindre la concentration de 20 μM .

- *Préparation du mix de la réaction de qPCR*

Un mix de réaction, contenant les amorces pour les 2 produits, est préparé. Le kit « LightCycler® 480 SYBR Green I Master » (*Roche*, #04707516001) est utilisé. Seize microlitres du mix présenté au Tableau 47 sont ajoutés à chaque puits d'une plaque 96-puits.

Tableau 47 – Composition du mix de la réaction de qPCR *multiplex* pour le test « Mesure de la longueur des télomères ».

	RÉACTIF	QUANTITÉ (μL)	RÉFÉRENCE
Télomères	Amorce sens (<i>telg</i>)	1	IDT
	Amorce anti-sens (<i>telc</i>)	1	IDT
Albumine	Amorce sens (<i>albd</i>)	1	IDT
	Amorce anti-sens (<i>albu</i>)	1	IDT
	Master	10	<i>Roche</i> , #04707516001
	H ₂ O PCR grade	2	<i>Roche</i> , #04707516001

- *Programme de qPCR*

Une fois le mix et les échantillons disposés dans la plaque, celle-ci est placée dans le LightCycler® 480 II (*Roche*) et le programme présenté au Tableau 48 est lancé.

Tableau 48 – Programme de cycles thermiques de la qPCR *multiplex* pour le test « Mesure de la longueur des télomères ». N/A : non applicable.

PROGRAMME	NOMBRE DE CYCLES	TEMPÉRATURE (°C)	DURÉE (HH:MM:SS)	MODE
Dénaturation	1	95	00:15:00	N/A
Hybridation	2	94	00:00:15	N/A
		49	00:00:15	N/A
Amplification	32	94	00:00:15	N/A
		62	00:00:10	N/A
		74	00:00:15	Acquisition
		84	00:00:10	N/A
		88	00:00:15	Acquisition

Méthodes mathématiques

Pour séparer le signal d'amplification des télomères et de l'albumine, le programme *LC480 conversion* a d'abord été utilisé. Le programme *LinRegPCR* a ensuite permis, à partir des données organisées, de calculer le Cp de chaque échantillon.

ANNEXE 5

Résultats complémentaires du test « Mesure de la longueur des télomères »

- Optimisation de la concentration en amorces télomériques : courbes de dissociation

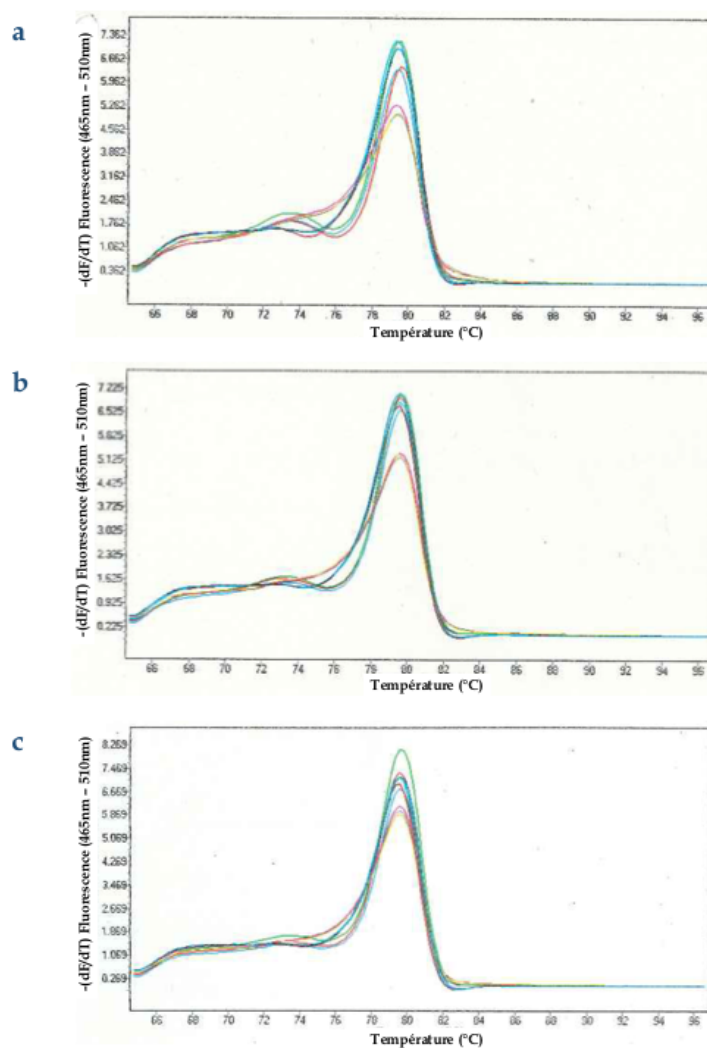


FIGURE 32 – Courbes de dissociation obtenues suite à l'utilisation de différentes combinaisons de concentration en amorces télomériques. a, $[telg] = 100$ nM et $[telc] = 100$ nM. b, $[telg] = 100$ nM et $[telc] = 300$ nM. c, $[telg] = 100$ nM et $[telc] = 500$ nM.

- *Passage en multiplex : investigation*
 - a. Combinaison des amorces télomériques et du gène de l'albumine

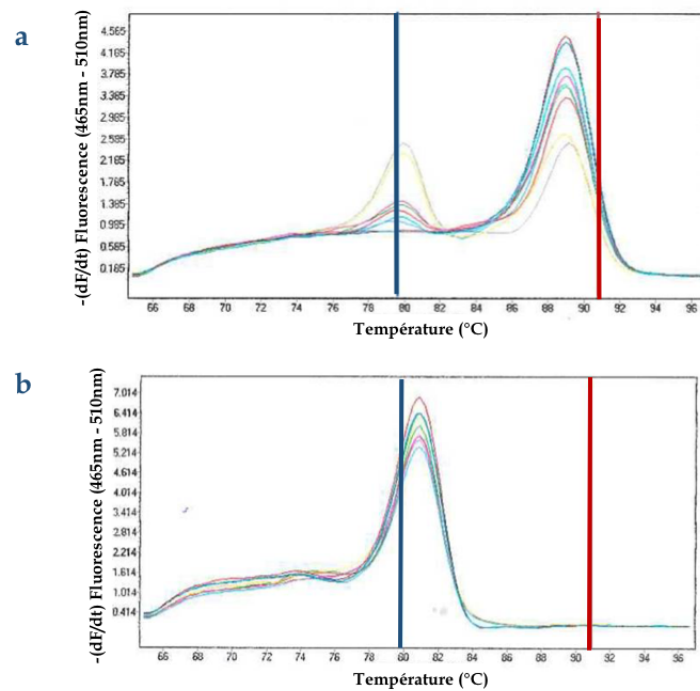


FIGURE 33 – Courbes de dissociation obtenues en combinant les amorces télomériques (dans différentes concentrations) avec chaque amorce du gène de l'albumine. a, *telg* (100 nM)/*telc* (500 nM) et *albd* (1 μ M). b, *telg* (100nM)/*telc* (500 nM) et *albu* (1 μ M).

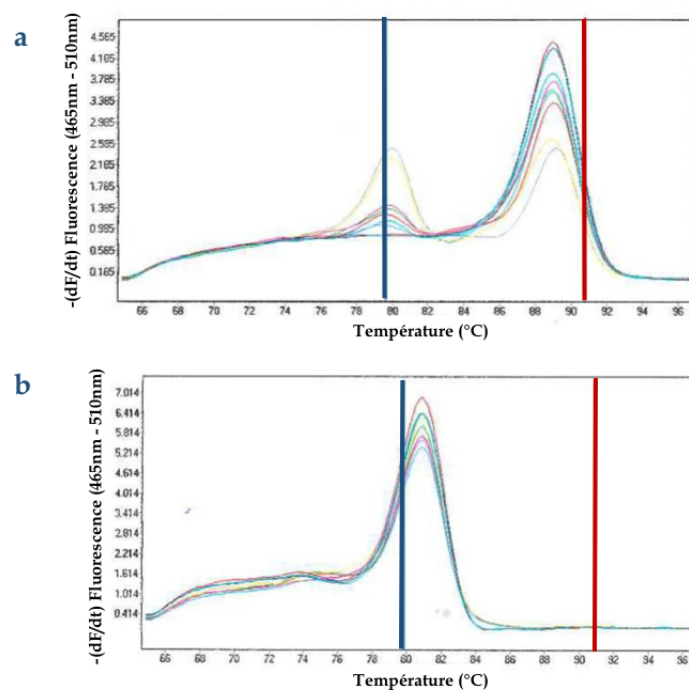
b. Utilisation d'un autre gène de référence : hémoglobine gamma (*HBG*)

FIGURE 34 – Courbes de dissociation obtenues en combinant les amorces télomériques (dans différentes concentrations) avec chaque amorce de du gène l'hémoglobine gamma. a, *telg* (100 nM)/*telc* (500 nM) et *hbgt* (1 μ M). b, *telg* (100 nM)/*telc* (500 nM) et *hbgu* (1 μ M).

- *Evolution de la longueur des télomères au fur et à mesure des passages*

Tableau 49 – Evolution du PDT (*Population Doubling Time*) au fur et à mesure des passages pour les lots C-Cure® analysés.

NUMÉRO DE PASSAGE	PDT (jours)		
	LOT C-CURE® 1	LOT C-CURE® 2	LOT C-CURE® 3
4	3,24	2,08	1,66
5	1,96	2,60	1,85
6	2,70	2,17	1,74
7	3,17	2,29	1,72
8	2,68	2,42	1,45
9	2,75	2,14	2,15
10	10,06	2,88	2,29
11		3,15	2,23
12		6,53	1,81
13		150,36	2,16
14			3,02
15			5,55
16			9,90
17			15,85

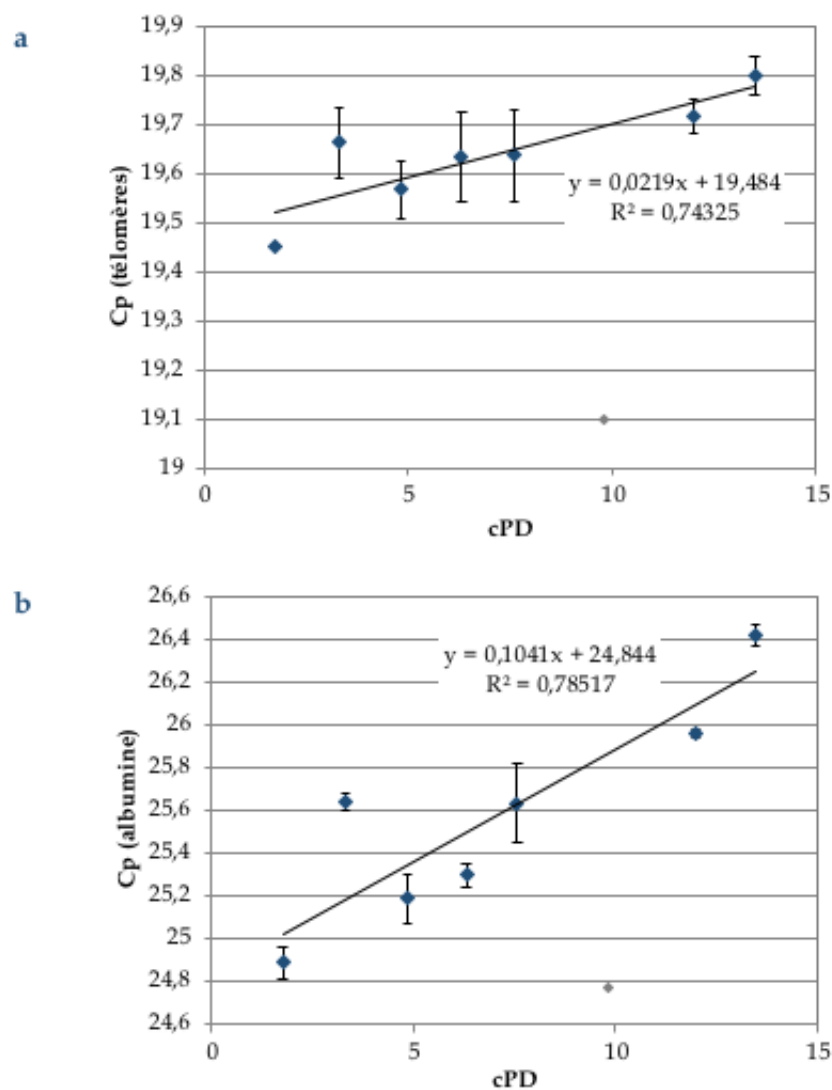


FIGURE 35 – Analyse individuelle du Cp de l’amplification télomérique et de l’amplification du gène de l’albumine a, évolution du Cp pour l’amplification télomérique pour le lot C-Cure® 1. b, évolution du Cp pour l’amplification du gène de l’albumine pour le lot C-Cure® 1. Le point gris représente une valeur hors-tendance, qui n’a pas été incluse dans la droite de régression.

Etude de marché

Durant cette année et demi de recherche, nous avons mené de nombreuses rencontres formelles et informelles avec les parties prenantes du secteur de la thérapie cellulaire en Belgique.

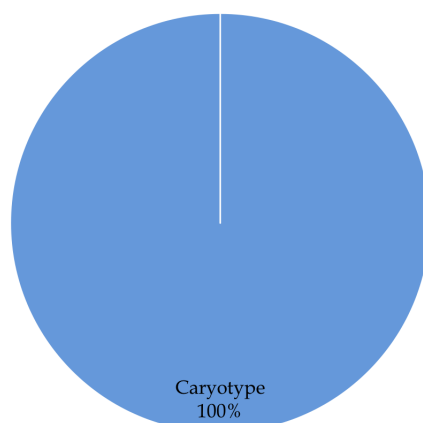
Nous présentons ici les résultats de l'étude de marché, qui concerne nos clients, ainsi que la retranscription des interviews réalisées dont nous avons pu garder une trace audio. Le contenu des autres a été inséré directement dans le reste du texte (notamment, *B&C Group, ING, MyMicroInvest, l'AFMPS, Roche, Eppendorf, Thermoscientific, Biotech Quality Assistance, Celyad, UCB, Biowin, etc.*)

B.1 Résultats de l'étude de marché

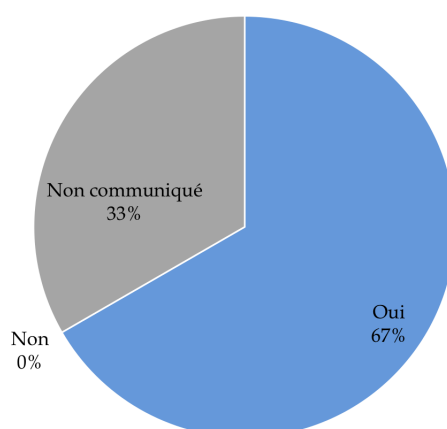
Etude réalisée auprès de cinq entreprises belges de thérapie cellulaire (*Celyad, Promethera, Novadip, Bone Therapeutics* et *Imcyse*) ainsi qu'une CDMO belge, *Masthercell* (n = 6).

- *Méthodes d'évaluation de la tumorigénicité in vitro dans le cadre de la libération de lots de thérapie cellulaire*

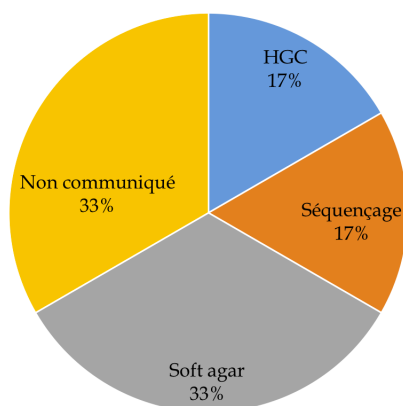
Utilisation du caryotype pour le *release* "sécurité"



Volonté de disposer d'alternatives au caryotype

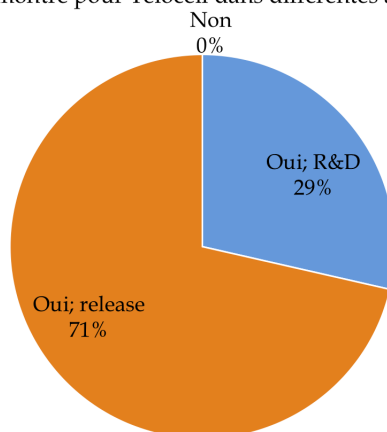


Utilisation des méthodes alternatives au caryotype, indicatives pour le *release* "sécurité"

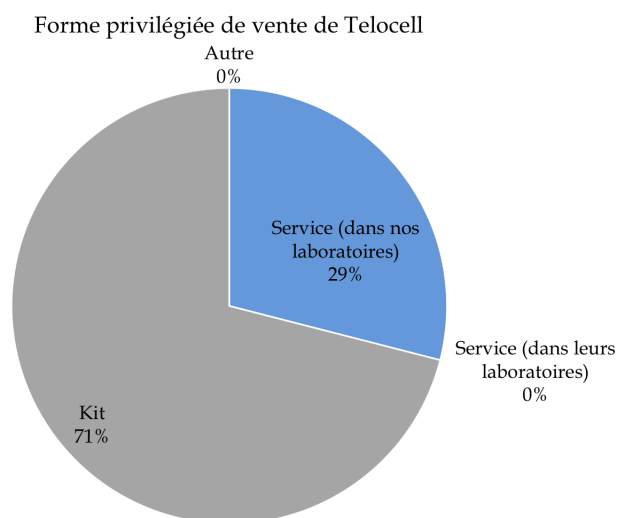


- *Intérêt démontré par les acteurs interrogés pour notre offre (Telocell). Si intérêt il y avait, nous avons demandé à l'acteur de préciser le cadre d'utilisation dans lequel Telocell serait pour lui le plus intéressant*

Intérêt démontré pour Telocell dans différentes applications



- *Forme préférée par le client pour la vente de Telocell*



B.2 Interviews

B.2.1 Biowin

Sylvie Ponchaut, *Managing Director* - 3 août 2015

Scancell : pour l’instant le test supporté par les autorités c’est le caryotype, mais il n’est pas pertinent et est cher et long et donc nous venons proposer une alternative. Nous voulons proposer notre produit aux entreprises de thérapie cellulaire. Qu’en pensez vous ?

Biowin : c’est la réglementation qui va faire le marché. Il faut travailler avec les autorités réglementaires. Une des possibilités est de faire le chemin avec un client et les autorités. Vous accrocher au train de quelqu’un qui a déjà des produits de la thérapie cellulaire déjà avancé dans les essais cliniques c’est bien. Les gens ont recours à un test si ils doivent absolument faire un test avant d’injecter les cellules au patient. C’est vrai que le caryotype n’est pas pertinent et qu’il faut profiter de ce manque en arrivant avec notre produit et se designer sa propre place dans le secteur. Vous devez confronter cette idée avec les responsables de production des différentes entreprises de thérapie cellulaire. Eux pourront vous indiquer les intérêts et les questions pratiques liés au projet.

Scancell : est ce que les hopitaux qui font de la recherche dans ce secteur pourrainer être des clients potentiels ?

Cela peut être intéressant mais cela reste très minime vu que les quantités sont vraiment petites.

Scancell : au niveau de l’expansion géographique, qu’en pensez vous et que conseillez vous ?

Oui il semble primordial de chercher à s’étendre à l’Europe et de commercialiser sur un territoire géographique plus grand. De plus il est difficile et important de proposer des tests qui peuvent être rendus rapidement.

Scancell : Biowin, qu’est ce ?

Association de membres qui regroupe plusieurs membres, dont des acteurs de la thérapie cellulaire. Vous avez déjà contacté ces membres donc on ne peut pas vous donner de contact direct pour ces membres. Malheureusement nous ne pouvons pas faire beaucoup plus pour vous à ce stade ci.

Scancell : pour finir avez-vous des suggestions pour notre futur ?

Pourquoi se limiter à la TH cellulaire, vous pourrez également vous diriger vers la « *drug discovery* » travailler sur des cellules classiques qui sont utilisées dans le milieu

de la découverte de médicament. Un test qu'on doit faire lors du développement de nouvelles molécules, un des tests est vérifier si l'effet de cette molécule n'a pas d'effet cancérigène. Mais alors il faut voir comment les entreprises de *drug discovery* font pour l'instant pour vérifier cela et voir si on peut aller là. Par contre, il est vrai qu'en thérapie cellulaire, étant donné que le marché est encore au stade de la naissance c'est plus facile pour convaincre les clients. Il est plus difficile de s'attaquer au marché de la drug discovery.

B.2.2 Bone Therapeutics

Nadège Grabowski, R&D Manager - 6 août 2015

- *Partie 1 - Questions concernant l'entreprise*

Antoine : Concernant votre produit de thérapie cellulaire, on se demandait dans quelle phase de développement vous étiez et combine de patients vous avez déjà pu traiter.

Nadège Grabowski : On a deux produits en phase clinique, avec différentes indications de l'os, pour les pathologies de l'os. On a ces deux produits qui sont en phase, selon les études, Ib-IIa et IIb-III. En fait on ne teste pas de patients sains parce qu'il n'y a pas d'intérêt de tester des patients sains dans le cadre de nos études. Et pour le nombre de patients, on a probablement du vous le dire, c'est fait par test statistique donc ça va vraiment dépendre de beaucoup d'études avec différents paramètres. Pour les premières phases (Ia, Ib, Iia), on va avoir un petit nombre de patients, peut-être jusqu'à 50 patients. Enfin, ça dépend : on peut avoir 18 patients. Après, c'est sûr, pour la dernière phase (IIb, III), qui est la phase juste avant la mise sur le marché, il peut y avoir beaucoup plus de patients. On a eu plus de 150 patients.

A : Pour vos deux produits, faites-vous de la thérapie cellulaire autologue ou allogénique ?

NG : Alors, il y a deux produits : un autologue et un allogénique. Preob® est autologue et Allob® est allogénique.

A : Vous êtes pas mal avancés au niveau des phases d'essais cliniques. En ce qui concerne la mise sur le marché, la commercialisation, avez-vous une estimation de quand ça se produirait ?

NG : On est rentré en bourse en février, donc c'est horizon 2020.

A : Et avez-vous déjà une estimation du nombre de patients que vous pourrez traiter une fois la mise sur marché accomplie ?

NG : Je n'ai pas de chiffres, parce que ça va dépendre beaucoup de l'indication, et donc des patients qui vont être malades au fait.

- *Partie 2 - Questions concernant les tests de release*

A : Sinon, au niveau des tests de *release* pour la détection du potentiel tumorigénique de vos lots, la plupart des personnes qu'on a rencontré utilisent le caryotype. Est-ce également votre cas ?

NG : Nous, le caryotype, on s'en sert pour valider les process. Après, c'est pas forcément un test de *release*. C'est pas toujours fait sur tous les lots. C'est vraiment des choses qui sont utilisées pour les validations. On va avoir beaucoup d'autres tests qu'on va faire, que je ne vais pas forcément pouvoir détailler avec vous. Le caryotype, c'est un

test qu'on sous-traite chez IPG et ce sont eux qui nous donnent les résultats. En ce qui concerne le développement d'un test de *release*, il faut savoir que vous avez 4 heures pour donner votre accord ou pas. C'est-à-dire que si vous ne pouvez pas faire votre test dans les 4h, vous ne pouvez pas le proposer comme test de *release*. Donc est-ce que vos mécanismes rentrent dans ces 4 heures ?

Charlotte : La plupart, oui. Mais pourtant, le caryotype, il prend plus que 4 heures. En fait, les informations que j'ai eu chez Celyad, c'est qu'ils font le caryotype pour tous les lots (ils font de l'autologue) et c'est vraiment une recommandation des autorités. Ils le font parce que les autorités le demandent. Ce n'est pas votre cas ?

NG : J'ai cherché hier, et je n'ai rien trouvé. On a fait des recherches dans l'ISO, on a regardé dans la MA (??), la FDA, on n'a pas trouvé.

C : Donc, pour prouver que vos lots n'ont pas de potentiel tumorigénique, vous faites d'autres tests ?

NG : Il y a d'autres tests qui sont fait, oui.

A : Et vous, en tant que scientifique active dans le secteur, que pensez-vous de la pertinence du caryotype ?

NG : Ca dépend à quel niveau on parle. Si on ne parle que du cancer, c'est pas forcément pertinent, puisque ça ne va pas donner tous les cancers et ça ne donne qu'un type d'information. Après, on peut faire d'autres tests : tumorigénicité in vivo, tests in vitro de prolifération, etc. Après voilà, le caryotype ne donne pas toute l'information. Mais aucun test ne va jamais donner toute l'information. Si on veut vraiment toute l'information, il faudrait faire une dizaine de tests.

A : Vous utilisez des tests pour valider vos process, mais faites-vous des tests directement sur les lots ?

NG : Oui, les tests de validation de process, ça se fait en amont. Mais il y a bien sûr beaucoup de tests de *release* qui sont réalisés sur nos lots.

A : Et tout ça, vous le faites chez vous ? Vous n'externalisez pas ?

NG : Oui. Je crois que tous les tests de *release* sont faits chez nous.

● *Partie 3 - Questions concernant le projet Scancell*

A : Au niveau de notre projet, si on venait en tant que société active, que penseriez-vous de ce genre de tests ? Cela vous serait-il utile ?

NG : Alors, ça serait utile voire indispensable si c'est obligatoire, sachant que si ce n'est pas obligatoire, personne ne va le faire. Parce qu'il y a déjà tellement d'autres choses qui sont obligatoires à faire que si vous vous situez dans un créneau qui n'est pas obligatoire, personne ne va vous suivre. En test de *release*, je précise. En recherche, ce n'est pas la même chose. Mais en termes de test de *release*, on ne fait que ce qui est obligatoire puisqu'un lot coûte déjà très cher, donc si en plus on doit rajouter des coûts en plus, c'est un peu embêtant.

A : Vous n’y voyez pas d’intérêt s’il n’y a pas les autorités derrière.

NG : Voilà. Je pense que vous aurez beaucoup de mal à venir proposer ces tests et que ça devienne intéressant pour les entreprises.

A : Si ce n’est pas obligatoire (si ce n’est pas un test de *release*), ça a peut être plus d’intérêt au niveau des recherches.

NG : Tout à fait. Parce que les tests de *release*, c’est vraiment très compliqué puisqu’il faut quelque chose qui soit fait rapidement et que ce soit facile, parce qu’il y a des lots qui sont libérés pendant la nuit donc il faut pouvoir le faire dans les 4 heures dans la nuit pour dire oui ou non à la libération du lot. Par contre, si c’est un test de *release* et qu’il est obligatoire, il n’y aurait plus le choix : on devra le faire. Maintenant, pour le faire accréditer auprès des autorités, je vous souhaite bon courage. Surtout dans le milieu de l’industrie pharmaceutique. Sachant que, d’après ce qu’on a pu lire, il y a beaucoup moins de restriction pour la thérapie cellulaire, ce qui est bizarre d’ailleurs.

A : C’est un domaine assez nouveau.

NG : Oui, ça doit aussi jouer et puis aussi, scientifiquement, un corps humain sain va avoir moins de mal à se débarrasser des cellules qu’on va lui injecter que d’un produit chimique. C’est peut être pour ça. Il y a un peu moins de réglementations, on est un petit peu dans un flou.

• *Partie 4 - Questions concernant la stratégie de distribution*

A : On avait établi plusieurs stratégies de distribution. Une première possibilité est que les échantillons soient transportés chez nous, pour faire les tests chez nous, dans nos laboratoires homologués. On avait établi également la possibilité d’un laboratoire mobile, mais depuis nos dernières rencontres, on a plus ou moins abandonné cette idée. Une autre stratégie serait que nos scientifiques viendraient faire les tests dans les laboratoires des clients ce qui, au niveau du Business Model, nous permettrait de ne pas avoir de laboratoires. Mais au vu des premières rencontres, ça risque d’être assez difficile étant donné que les scientifiques doivent suivre de formations pour rentrer dans les laboratoires certifiés GMP. La troisième stratégie que l’on a établie depuis est la possibilité de commercialiser les tests sous forme de kits.

NG : C’est ce que j’allais vous dire, c’est peut être la meilleure option. Dans vos laboratoires, ça poserait problème pour un test de *release* qui doit être réalisé dans les 4 heures. Dans nos laboratoires, ce qui me poserait surtout problème, ce serait plutôt la confidentialité. Après, oui, bien sûr, il faut être accrédité pour travailler dans les laboratoires, et tout ça va avoir attrait à la confidentialité. Pour nous c’est le gros problème. Je peux vous demander pourquoi vous avez abandonné l’idée du camion ?

A : Au niveau des certifications, faire homologuer un laboratoire mobile est

compliqué car il n'a pas d'adresse, il n'est pas très hermétique, etc. Donc on a rencontré des problèmes à ce niveau-là. On n'a pas abandonné l'idée, mais c'est une des dernières possibilités à envisager ; c'est ce qui est ressorti de premières interviews.

NG : J'avoue que le camion, ça paraît difficile à homologuer. Parce que je crois qu'il faut que ce soit GMP, même si c'est des tests de *release*, donc ça paraît un peu compliqué à faire. Après, pensez au camion du don du sang, ça se fait très bien. Donc on s'est dit que peut-être, il y avait quelque chose à creuser, que c'était peut-être possible de faire quelque chose. Ca dépend aussi du matériel que vous utilisez. Pour vos tests, de quelles machines avez-vous besoin ?

C : Les tests se basent sur les techniques de qPCR et ELISA. Il faut donc une machine de qPCR et un lecteur d'absorbance.

NG : Oui, donc pour la machine de qPCR, il faut un endroit stable, elle ne peut pas bouger. Le kit me semble donc la meilleure idée. Vous proposez quelque chose de tout prêt, que l'entreprise fait directement.

A : Le prix joue-t-il un rôle prédominant dans le choix d'une stratégie ?

NG : Le prix va jouer un rôle prédominant si vous êtes pas tous seuls sur le marché. Si votre test est rendu obligatoire et que vous êtes les seuls sur le marché, le prix ne va pas jouer. A partir du moment où vous n'êtes plus les seuls sur le marché, forcément que le prix va rentrer en ligne de compte. Après, bien sûr que le prix va être important, puisqu'il va augmenter le prix même d'un lot. L'estimation du prix d'un lot clinique, c'est entre 10 000 et 40 000 €, hors thérapie cellulaire. Avec thérapie cellulaire, on est dans la fourchette haute à 40 000 €. Donc je suppose que votre kit ne va pas être à plus que 500 €. Un kit plus cher que 500 €, c'est plus cher qu'un ELISA, ça devient cher.

A : On n'a pas fait d'estimations précises pour l'instant. Si on est seuls sur le marché, on peut se permettre d'être un peu plus cher.

NG : Oui, mais tout en sachant que vous ne serez pas les seuls très longtemps.

A : On avait également pensé à contacter les hôpitaux et centres de recherche qui font de la thérapie cellulaire de leur côté. Pensez-vous que ce genre de tests serait intéressant pour eux ?

NG : Qu'est ce que ça apporte par rapport à une PCR classique ? Vous travaillez à partir de techniques qui existent déjà, donc quel est votre valeur ajoutée, scientifiquement ?

C : On travaille à partir d'échantillons de la thérapie cellulaire, et les tests sont développés spécifiquement dans cette application.

NG : Et c'est applicable à tous les types cellulaires ?

C : D'après les informations récoltées chez Celyad et les contacts qu'on a eu avec quelques scientifiques, a priori oui. Je ne peux pas me prononcer avec certitudes pour l'instant, un développement ultérieur sera nécessaire.

NG : Et il y a déjà des kits qui utilisent cette méthode ?

C : Pour un test, on travaille déjà à partir d'un kit commercial et on le module pour la thérapie cellulaire. Donc ce kit existe, mais pas pour l'application précise

qu'on veut en faire. D'après les premières recherches que l'on a faites, on n'aurait pas de concurrents directs en Belgique. Beaucoup d'entrants potentiels (toutes les CROs qui font des tests sur mesure en fonction de la demande du client), mais de vraiment de concurrents directs.

NG : Et ImmuneHealth ne fait pas déjà tout ça ?

C : On nous en a parlé aux rendez-vous précédents, mais en faisant des recherches sur leur site, je n'ai pas vu qu'ils faisaient spécifiquement ces tests là. Ils font des tests de qPCR pour voir l'expression d'un gène (ce que la plupart des CROs proposent) et l'entreprise choisit le gène qu'elle veut. Je les ai donc mis dans la catégorie « entrants potentiels » parce qu'ils n'ont pas encore de tests développés et validés applicables à la thérapie cellulaire comme nous les aurions.

A : Mais ils ont les ressources pour venir sur le marché s'ils voient que ça marche ou que c'est obligatoire. Ce sont des gens qui pourraient venir sur nos plats de bande, mais à ce stade-ci pas encore.

NG : D'accord. Et donc, vous votre idée, c'est de tout tester sur une plaque 96-puits en fait ?

C : Non, il ne s'agit pas d'un test où plusieurs choses sont mesurées, mais bien de plusieurs tests différents. Donc si on devait le commercialiser sous cette forme, on ferait 3 kits, et non un.

NG : Donc ce sont 3 tests que vous rajouteriez à tous les tests de *release* qui existent déjà.

C : Oui, c'est ça. Si on le fait dans nos laboratoires, on avait pensé, pour un développement futur, à faire une liste (avec une multitude de tests destinés à la détection du potentiel tumorigénique), un peu à la manière des prises de sang. Les clients cocheraient ceux qu'ils désirent qu'on réalise. Cela nous permettrait d'avoir une offre plus complète que celle qu'on propose actuellement. On est tout à fait conscient que ces 3 tests ne mesurent qu'un mécanisme. Si on veut être les premiers sur le marché, on ne peut pas se permettre de développer uniquement ceux-là.

NG : Et vous devez créer un Business Plan sur combien de temps ?

A : 3 à 5 ans

NG : Et vous envisageriez comment cette entreprise ? Quel serait le point de départ de votre entreprise ? Maintenant, si vous avez 2 millions pour commencer, qu'est ce que vous faites ?

A : On finit d'abord le développement de ces tests-ci, puis on engage des spécialistes, des experts pour développer d'autres tests pour s'aligner à l'offre existante et avoir notre plus (ce que nous on a et que les autres n'ont pas).

NG : Donc votre première idée, c'est de développer plus de tests ?

C : En fait, pour l'instant, on a plusieurs options. Soit on développe plus de tests, soit on optimise les tests pour qu'ils soient utilisables par plusieurs types de clients, etc. Pour l'instant, on est un peu...

NG : N'oubliez pas l'étape d'accréditation. Parce que là, il y en a bien pour 5-6 ans quand même.

C : On ne s'était pas rendus compte que c'était aussi long.

NG : Enfin je ne sais pas exactement combien de temps ça peut prendre mais le temps d'écrire tous les dossiers. . . Peut-être pas 5-6 ans, mais je dirais quand même 2-3 ans. Vous n'allez pas envoyer une lettre aux autorités en disant « Bonjour, on voudrait accréditer ça ».

A : Non, ça on se doutait quand même. On est jeunes mais on se rend bien compte que c'est quelque chose de très compliqué et que ce ne sera peut être jamais possible.

C : C'est pour ça qu'on doit établir plusieurs stratégies, en fonction de leur accréditation ou non. . .

NG : C'est vrai que le fait de vous cibler uniquement sur les tests de *release*, c'est vous fermer des portes. Parce que personnellement, je n'aurais jamais pensé à faire un test de *release*. A faire un kit qui n'existe pas encore pour la recherche, oui. Mais de vouloir créer un test pour en faire un test de *release*, c'est quelque chose de monstrueux. Il y a peut être une très bonne idée sur les tests, une bonne idée de les combiner et d'en faire un kit, mais de là à faire un test de *release*. . . Parce que ça veut dire que quand vous allez fabriquer vos kits, vous allez devoir travailler dans des conditions qui fait qu'on peut les utiliser pour le développement des tests cliniques et pas uniquement pour l'in vitro. Donc ça veut dire que vous allez devoir être validé en GMP et tout ce qui peut bien vous passer par la tête. Ça vous permettra certes de le vendre plus cher, mais ça va vous coûter extrêmement cher aussi. Donc le fait de faire un test de *release*, c'est vous fermer beaucoup de portes.

C : En même temps, si on en fait pas un test de *release*, il ne sera pas obligatoire et donc il risque de ne pas intéresser les entreprises, si ?

NG : Oui, mais d'en faire dans un premier temps un test de *release*, c'est compliqué.

C : Oui, on pourra peut être l'envisager par la suite.

NG : Parce que vous allez avoir du mal à faire accepter quelque chose qui n'aura pas prouvé son intérêt. Parce que finalement, seulement vous allez démontrer son intérêt alors qu'il faut le démontrer sur des centaines de milliers de cellules, avec des centaines de résultats, que vous n'allez pas pouvoir produire. Et puis on va vous demander de travailler à chaque fois avec des cellules différentes, donc il faut savoir ce que ça implique par rapport à vos tests. Il faut fournir des résultats qui sont cohérents, et ça vous ne pouvez le faire sans la R&D. Et vous ne pouvez pas le faire si c'est un test de *release*. Un test de *release*, il est basé sur des choses dont on sait que ça fonctionne. Tout bêtement, le test de *release* le plus facile, c'est le Bleu de Trypan. La première publication date de 1963 je crois, donc vous voyez par rapport à quoi vous vous situez ! C'est quelque chose qui est validé, connu, limite évident. Donc pour que votre test commence à devenir quelque chose d'évident, il faut générer des résultats. Enormément de résultats. A travers le monde.

A : Mais au niveau de la recherche clinique, ça reste intéressant.

NG : En recherche clinique, tout est intéressant.

A : Pour la validation de process. Et ça vous faites continuellement ? Même une fois que vous aurez un produit sur le marché ?

NG : Oui, ça on fait tout le temps. Parce qu'on va continuer à le faire sur d'autres cellules qui vont arriver, on va devoir refaire des tests. Donc ça, c'est en continu. Mais le fait de vous concentrer uniquement sur un test de *release*, c'est. . .

C : Ambitieux.

A : Ou naïf (rires).

NG : Selon moi, mais je peux me tromper bien sûr ! Déjà parce que je ne travaille pas en QC (Quality Control), ceux qui réalisent ces tests de *release*. Mais je vois bien ce qu'est un test de *release*, je vois bien comment on propose un test de *release* parce que c'est la recherche qui les démarre, le nombre de data qu'on doit déjà générer alors que ça a déjà démontré à travers mille et une publi que c'est intéressant, que c'est des produits adaptés pour le développement clinique. Tout ça pour dire « on peut s'en servir », alors que ce n'est même pas encore du *release*.

A : D'accord. On a traversé toutes les questions, c'était très enrichissant. On a eu beaucoup d'informations intéressantes, beaucoup de choses à approfondir, donc on va travailler là-dessus. Merci beaucoup de nous avoir accordé un peu de votre temps.

NG : Je vous en prie.

B.2.3 MasTherCell

Sandrine Mores, QC Manager et Gisèle Deblandre - 3 août 2015

Scancell : Quand est-ce que vous prenez en charge la production ? Ou bine vous développez avec et pour eux ?

MasTherCell : Cela dépend du client on fait les deux. Parfois on intervient dès le début du projet qui n'ont fait que des essais sur animaux, aucun test humains etc. Mais on a également d'autres projets qu'on prend plus tard avec des clients ayant des projets plus aboutis, ils ont déjà réalisés des phases d'essais cliniques, etc. Pour ces entreprises nous réalisons donc aussi des tests afin de vérifier la qualité des lots produits. Nous passons par le caryotype et au début par des tests plus conséquents comme l'hybridation.

Est-ce que vous externaliser vos tests de *release* ? Connaissances d'autres tests avec d'autres entreprises ?

Nos premiers partenaires travaillaient avec des Test part sénescence, et agar. Les tests caryotypes sont externaliser également.

Nous nous demandions si le produit qu'on propose vous semble intéressant et dans quel sens ? Nous pensons notamment à valider le test pour qu'il soit équivalent au caryotype afin de ne plus devoir passer par le caryotype ?

Si vous voulez que les entreprises soient intéressées par votre technique, le fait de passer par les autorités ce serait vraiment quelque chose d'intéressant. Les entreprises sont parfois frileuse, oui peut être le caryotype c'est pas idéal mais les autorités sont contentes avec ça. Elles vont pas prendre des risques tant qu'elles ne sont pas sur qu'on ne détecte pas des faux positifs.

Difficile le contact avec les autorités comment s'y prendre ? Nous comptons travailler avec des entreprises de thérapie cellulaire qui seraient intéressées.

Il faut venir avec une méthode validée sinon ils ne pourront pas analyser. Il faut faire des liens avec ce qui existe déjà. Argumenter aussi sur le nombre de cellules qui sont regardées. Les caryotypes ils analysent que 30 cellules voir même que 20. Montrer que vous pouvez détecter une cellule à potentiel tumoral dans un lot beaucoup plus grand. Mais le problème c'est que cela peut faire peur aux sociétés car ils ne veulent peut être pas avoir trop d'informations. En thérapie allogénique là ils ont droit à zero fautes. En effet c'est intéressant, ici nous avons traitement pour la sclérose en plaques on a pas envie d'injecter des cellules cancéreuses. La difficulté est aussi de convaincre les entreprises que votre méthode de screening est meilleure et en vaut la peine. Il faut assurer une bonne sensibilité. Sur le principe si vous avez quelque chose de plus sensible et validé c'est tout bénéfique. Le plus facile pour se faire accepter par les autorités c'est en effet de travailler avec les entreprises actives dans la thérapie cellulaire. La clé c'est dans le rapport de validation. Pas nécessairement dans la pharmacopée mais il faut que l'entreprise soit suffisamment confiante donc première chose qu'on va vous demander

c'est le rapport de validation. Une fois qu'on a le feu vert des autorités ça convainc les entreprises car ils savent que si ils utilisent ça ils sont couvert par les autorités.

Est-ce possible malgré tout de commercialiser sans validation ?

Oui cela reste possible de convaincre les autorités mais alors il faut vraiment un rapport de validation blindé. C'est grâce à cela qu'ils vont croire en votre produit et être convaincu.

Pour la commercialisation on a établi plusieurs stratégies. Tout d'abord, les échantillons seraient transportés dans nos laboratoires et nos scientifiques s'occuperaient des tests (service). Deuxième possibilité, un de nos scientifiques vient dans les laboratoires pour réaliser les tests. Troisièmement, c'est la vente des tests sous forme de kits.

Nous on préfère la troisième option. Dans la première il faut payer la logistique etc. et c'est compliqué de transporter les cellules il faut être sûr que vous soyez certifié GMP. Ce serait le plus valable d'avoir un kit. Un scientifique dans les laboratoires du client c'est très compliqué et il doit savoir travaillé selon les règles GMP, il doit être formé, etc. Il doit être disponible à tout moment, encore beaucoup de produits qui doivent être injectés frais. Dans vos laboratoire, sous forme de service c'est possible mais alors il faut un laboratoire accrédité etc. A long terme la solution du kit est la meilleure solution mais c'est vrai qu'à court terme c'est peut-être pas la plus évidente et qu'il faudra des étapes intermédiaires. De plus les machines que vous avez besoin elles sont souvent déjà dans les laboratoires des entreprises cellulaires.

On s'est penché sur les entreprises de thérapie cellulaire en Belgique et on se demande si selon vous cela pourrait être une bonne idée de se tourner vers les hôpitaux et autres centres de recherches ?

C'est vrai qu'il y a beaucoup de petites structures qui avancent pas mal de développement et ils seraient sûrement intéressé par un moyen de vérifier que leur développement ne créent rien de non voulu. Ces structures peuvent être utilisés pour faire du beta testing pour vous aider à construire votre dossier.

L'idée serait de développer un test plus complet et d'autres tests qui pourraient compléter le premier kit. Que pensez-vous d'une telle évolution, avec une gamme plus importantes de tests proposés ?

Il faut voir les différents tests qui existent et voir lequel a le plus de chance de s'imposer. Il y avait déjà eu des propositions qui avaient émergées par ce que plusieurs ont déjà émis des critiques du caryotype. Un moment un autre il faudra proposer une batterie de tests qui vérifieront de manière complète les lots cellulaires à injecter.

B.2.4 Novadip

Roland Gordon-Beresford, *Chief RA/IP Officer* - 3 août 2015

- *Partie 1 - Questions concernant l'entreprise*

Scancell : A quel stade de développement se situe actuellement Novadip et avez-vous déjà commencé une phase d'essai clinique ?

Novadip : Novadip est une spin off de l'UCL, ils ont dû passer par une levée de fonds, afin de pouvoir commencer les essais cliniques. Une série d'étude préclinique ont été réalisées permettant de faire la demande d'étude clinique. Ensuite Novadip a pu commencer par la phase 1, première évaluation de la thérapie cellulaire dans l'homme. Novadip est également passé par le système d'exemption hospitalière, ils ont 15 candidats qui répondent au critère.

Combien de patient ?

Bonne question mais pas de réponse publique. Sans dévoiler un nombre plus précis on peut dire quelques dizaines. Pourquoi ce nombre ? Tout d'abord pour une considération éthique, il faut limiter et commencer prudemment. Traditionnellement on commence avec une petite dizaine de patient. Deuxièmement c'est extrêmement coûteux. En effet, il est déconseillé financièrement parlant de faire une large étude clinique avec un produit qui n'a pas encore sa forme finale. Il faut également vérifier que ce qui est prévu est pratique pour l'utilisation faite par les chirurgiens. Il est possible également de rencontrer d'autres problèmes technique. Il est donc nécessaire d'avancer pas à pas.

Avez-vous à ce stade du développement de l'entreprise et du produit une idée de la date potentielle de commercialisation ?

Le développement d'un médicament est considéré de manière optimiste par les investisseurs. Il faut considérer un minimum de 5 ans en partant du principe que tout se passe bien. Pas déraisonnable vu le projet. En tout cas moins de 10 ans. On a une expérience en exemption hospitalière, on sait comment le chirurgien travaille avec notre produit. On sait comment le produit réagit avec les animaux ou les humains. Ici on sait déjà que le produit est efficace et que la thérapie fonctionne mais elle n'est pas encore développée correctement. Alors que d'habitude on développe d'abord correctement et puis on vérifie si quand même efficace.

Nombre de patient que vous désirez soigner dans les années à venir ? Quels sont les chiffres ?

Cela dépend de l'indication thérapeutique. La thérapie cellulaire est inévitablement chère à fabriquer donc cela va se vendre cher. Plusieurs milliers d'euros. Il n'est donc pas nécessaire d'en vendre une quantité insurmontable pour être profitable. Il y a des limites technologie pour la fabrication. Car il faut produire en salle aseptique. On ne peut pas

en produire des centaines de milliers mais il faut trouver un point d'équilibre entre le nombre de lots qu'on peut industriellement produire et le prix qu'on peut vendre. Chaque technologie a se point d'équilibre. Il faut donc aller vers les indications les plus profitables. Pour Novadip c'est la fusion spinale lombaire : faire intentionnellement chez une personne qui en a besoin une fusion des vertèbres. Nombre de fusions lombaire faites dans le monde sont de plusieurs millions. Mais il y a plusieurs types : soit fusion simple : un disque, double : deux disques, ou complexe. Fusion complexe pas encore de solution standard. Patient dans un tel état que les chirurgiens font ce qu'ils peuvent mais jamais satisfaisant. Traitement actuel autogreffe, provoquer une fusion en insérant des petites cages et farcissant ces cages avec de l'os pris sur la hanche du patient : deux inconvénients : douleur définitive subsiste, pas esthétique et limite de matériaux : chaque être humaine n'a que deux hanches. On peut avoir un besoin de fusion pour différentes raisons. Il faut trouver la bonne : pas trop de patients, pas non plus trop peu.

Est-ce que Bone Therapeutics peut être qualifié de concurrents ou non ?

Bone Therapeutics voit en Novadip des concurrents mais l'inverse n'est pas vrai, c'est-à-dire que Novadip ne les voit pas comme des concurrents en tant que tel. La raison est qu'il y a une différence fondamentale dans la technologie. Le creos des deux entreprises est complètement différent. Novadip produit une matière un peu comme une méduse. Bone Therapeutics, produit plus quelque chose de liquide. Bone Therapeutics s'adresse à des petits défauts alors que Novadip se concentre sur des gros défauts. Ils traitent donc des indications différentes Sous la pression de Novadip, Bone Therapeutics s'est lancé dans d'autres indications. Il y a de la place sur le marché. C'est dans l'intérêt pour Novadip de montrer qu'on peut réussir dans l'os. Logique que Bone Therapeutics les voit comme concurrent, par ce que les micro défauts (petit en taille pas en importance) peuvent être utilisé par le produit de Novadip alors que le produit de Bone Therapeutics ne peut pas être utilisé dans les gros défauts. En fonction des indications il y a d'autres concurrents dans le monde mais il y a aussi quantité d'indication dans lesquels il n'y aura pas de concurrents.

Vous visez quel marché géographique ?

Nous avons une visée mondiale mais modeste. Cela ne sert à rien de prétendre que dans 5 ans nous serons une boîte mondiale. Maintenant le type de patient que nous visons sont dans le monde. Nous avons des pathologies dont le traitement est limité à des pays médicalement développés. On s'adresse plutôt à des pays avec compétences et infrastructures médicales raisonnables : USA, UE, Asie développée, Océanie, certains pays en Amérique latine et en Afrique. En gros la liste habituelle. Ce qu'il y a de particulier : L'union européenne évidence car nous y sommes et les USA, évident car gros tas de dollars à gagner. Maintenant notons que certains pays en Asie, sont très attractifs car se développent et on besoin pas mal de ce genre de thérapie, et évolution légale dans le pays qui le rend attractif, notamment au Japon. Océanie, immense marché aussi. Très content avec plusieurs dizaines de milliers de patient. On les prend ou ? La

ou on peut le vendre le plus cher et ou on peut s'installer le plus facilement.

- *Partie 2 - Questions concernant les tests de release*

Utilisez vous des test de *release* ? Si oui, quel type de test utilisez vous ?

Obligation quand on veut faire une étude clinique, test de *release*. En matière de thérapie cellulaire, il y a une obligation de tester la stabilité génique. En matière de stabilité génique, la tumorigénicité n'est pas à proprement parler la question d'intérêt mais c'est plutôt la capacité des cellules à échappée à ce qu'elle font post injection. Ce n'est pas uniquement la tumorigénicité. Cela peut croire autrement. On va regarder si il n'y a pas un potentiel clonogénique également. Pas forcément voir si les cellules elles même dans leur flasque in vitro. Mais aussi capacité à induire post injection une tumeur chez un patient. Un des outils pour résoudre cette question c'est le caryotype. Une des rares méthodes qui est communément acceptée. On l'accepte à défaut de meilleur car c'est une méthode relativement grossière et peu précise. Sachant qu'en pratique on voit rarement quelque chose de pertinent. Le caryotype est essentiellement utilisé en biologie clinique. On regarde chez des gens qu'on sait qu'ils ont des anomalies on regarde juste le type d'anomalies. Pour les thérapies cellulaires on reprend la même technologie mais personne n'a démontré que c'était pertinent. Mais bon on a rien d'autre. Mais parfois difficile de justifier que même si caryotype bizarre ce n'est pas fondamentalement grave. C'est là que vient l'idée de supplémente le caryotype par d'autres approches avec à terme le remplacer par une autre approche. Voilà le champ de développement. Tout le monde est d'accord que le caryotype est long c'est difficile. En plus c'est cher et compliqué logistiquement. Cela a donc tous les inconvénients possibles. L'approche des télomères est une approche pertinente mais répondons nous complètement à la question du potentiel tumorigénique et clonogénique car tout n'est pas dans la télomérase. Par contre c'est une technologie peu coûteuse, qui sont validables, On peut démontrer la robustesse de la méthode, sa linéarité, sa précision, etc. C'est donc très attractif. On aimerait développer des technologie qui en quelques heures permettrait de valider la stabilité génique d'un lot. Cela s'est juste une question qualitative.

Vous avez dit utiliser les test de caryotype, est-ce que vous les externalisez ?

Oui on externalise. Pas identifier de partenaires spécifiques. Il y a plusieurs possibles. Les laboratoires doivent tout d'abord être certifiés et à partir de là il y en a plusieurs.

Pour faire le lien entre caryotype et ce que nous on proposerait ? Y a t'il d'autres tests qui existent, proposé par des entreprises en Belgique ou ailleurs ?

Masthercell, aujourd'hui ne se spécialise pas dans le contrôle qualité. Ce n'est pas une entreprise de service de contrôle qualité comme pourrait l'être SGS. Ils pourraient se décider de se lancer dans les analyses génétiques, mais ne le font pas pour le moment.

D'autres de ce type, Quality Assistance, mais ne le font pas pour le moment. En France, il y en a plusieurs mais un notamment bien connu c'est Texel, bonne réputation, plus cher mais sont capable de faire. Ils peuvent développer une nouvelle méthode, suffit de payer. Ils travaillent tous les jours y compris les jours fériés. Ce qui peut être pratique. Tous les pays, avec un niveau de développement pharmaceutique correct ont des sociétés capables de faire du testing génique, mais pas pour ça qu'elles le font. La méthode est très connue : caryotype, télomérase, oui. Le tout est la capacité de le valider, il faut choisir des partenaires qui peuvent le valider. Pas indispensable d'avoir un système GMP. Il faut avoir un système de qualité comparable. On peut décider de fabriquer un système de qualité différent mais comparable, mais c'est le plus facile par ce que c'est le connu. Probable que certains le font déjà.

- *Partie 3 - Questions concernant le projet Scancell*

Notre test c'est bien mais pourquoi vous viendriez plutôt chez nous et pas un autre ?

Il faut se démarquer par le prix et la qualité du service. Ou bien on a quelque chose de vraiment particulier. La proximité client est une valeur ajoutée dans un secteur émergent ou tout est compliqué et où les gens aiment se connaître. Cela peut faciliter la vie et améliorer le service. Un moyen vraiment de se protéger de la concurrence est de breveter notre méthode car elle est originale, plus rapide, améliorée, etc. C'est une possibilité. Brevet est un droit d'interdire. Une amélioration d'une technique peut valoir un brevet. On ne pouvait pas breveter le tout mais on va breveter les parties. Dans la valorisation d'un plan d'affaires, les services qu'elle propose jouent quelque chose mais un autre type d'avoir immatériel c'est la PI, cela peut valoir de l'argent, sans oublier la possibilité d'octroyer des licences.

Le but de notre projet est de faire accréditer les tests, qu'en pensez vous ? En remplacement ou complément du caryotype.

Pas possible d'accréditer un test et de le rendre obligatoire. Dans toute la réglementation pharmaceutique toujours possible de ne pas les appliquer si on juge que cela n'est pas utile si on dit qu'il ne faut pas l'utiliser. On peut parfaitement décider de ne pas l'appliquer si quand on constitue le dossier on prouve que cela n'est pas nécessaire car on fait différemment et ça marche aussi bien. Jamais les autorités ne peuvent obliger un standard. Mais cela peut être difficile d'en faire approuver un nouveau standard. Maintenant, ce qu'il est possible de faire c'est d'avoir un système de qualité reconnu des normes ISO, etc. Ça cela peut se faire certifier. Ensuite, il est possible que ce que font les autorités c'est regarder si nouvelles techniques sont aussi efficaces que les premières. Ils regardent si cela vaut la peine ou pas. Pour s'aider il faut convaincre le premier client et lui va aller avec nous aux autorités pour dire qu'il utilise ça et montrer que tout ça est merveilleux et extraordinaire et ça marche vraiment. Le fabricant de médicament va aller dans tous les congrès en parler et dire que son produit qu'il utilise est plus

pratique. Le plus utile est donc d'avoir le premier client. Il faut arriver avec un produit en béton, convaincre qu'on est les experts et qu'on a de l'avenir, trouver le premier client et puis soutenir ce client dans son développement en étant à l'écoute de sa demande. Si la technologie marche bien et le service est bon après cela va s'imposer.

Différentes stratégies de distribution. a) propre laboratoire test réalisé en laboratoire b) nos scientifiques viennent dans vos laboratoires c) laboratoire mobile

Laboratoire mobile pas possible par ce que tout simplement pour les certifications il faut une adresse et une camionnette cela n'a pas d'adresse. C'est tout bête mais un certificat GMP délivré par les autorités il est nécessaire dans le formulaire d'avoir une adresse. Cela doit être inspectable 7/7j 24H/24. Avant d'avoir heurter ce mur il y a d'autres limites, c'est au niveau opérationnel c'est compliqué. De plus c'est breveté donc plutôt à éviter. Les tests réalisés dans vos laboratoires c'est possible mais si on est proche de nos clients car parfois le transport de cellules est délicat. Il faut être à un endroit où le transport logistique n'est pas trop cher. Il faut voir comment doivent être conservés les échantillons. Il faut en tenir compte. Il y a des risques quand on transporte les cellules, il y a plus de normes à respecter etc. Société qui vient avec ses scientifiques dans le laboratoire, celle là ne va pas marcher, tout d'abord pour la confidentialité, toutes les entreprises de thérapie cellulaire sont assez nerveuse et ne veulent pas prendre le risque que leur propriété intellectuelle soit divulguée. En plus toutes les contraintes si ce sont des environnements aseptiques. Seuls méthodes possibles : soit on met un labo à proximité des entreprises, en Belgique un suffit. EN France, on cible Paris, Allemagne les grands centres. Ou bien le plus facile, on produit des kits qui peuvent se vendre et si nécessaire on forme les QC manager de nos clients et comme ça on n'a plus aucune contrainte. Le mieux est de placé la technologie chez le client, dans le cas où c'est possible.

Que pensez vous de cibler également comme clientèle les centre hospitaliers ?

L'approche est raisonnable mais il faut en comprendre les limites. Un débat au niveau européen. C'est ce qu'on appelle les exemptions hospitalière. Le règlement sur les ATMP nous dit que les ATMP sont des médicaments et comme tel doivent être développés comme des médicaments mais ils ont certaines spécificités et dans certains cas on peut faire des exemptions hospitalières : faire une thérapie cellulaire ; dans un pays précis, et procédé unique. De l'autre côté on a le médicament fabrication industrielle. D'un côté c'est l'industrie, procédé bien établi, certifié etc. De l'autre côté c'est de l'artisanat médical au cas par cas. Quand l'artisanat devient industriel, c'est là que se trouve tout le débat. Personne ne veut brider la recherche médicale dans son pays. Plutôt que de chiffrer quand est-ce que cela devient de l'industriel et plus de l'artisanat, la Belgique propose que c'est ok tant que il n'y a pas d'alternative de traitement. Cela peut donc aller très loin. De plus ils font leurs tests souvent en interne mais bon rien n'est impossible et si le produit est vraiment de haute qualité et alors ils accepteront et le prendront.

B.2.5 Promethera

Kris Gellynck, *R&D Manager* - 3 août 2015

Scancell : Nous avons une alternative au test actuel de caryotype. Un package de plusieurs tests pour détecter le potentiel tumoral des cellules. Ils sont moins chers, plus rapide et scientifiquement plus pertinent. Qu'en pensez-vous ?

Promethera : Si il est possible pour les entreprises de thérapie cellulaire d'utiliser vos tests en interne cela devient vraiment intéressant.

Promethera, ou en êtes vous, combien de patient avez vous déjà pu soigner ?

On est dans la phase 2b, et injecté à plus de 20 patients.

Quand est la date de commercialisation esperée ? Une fois sur le marché, quels sont vos objectifs de vente ?

Si tout continue comme prévu on pourrait commercialiser vers 2017. Bonne question, nous espérons dès la première année traiter plus de 100 patients.

Quels sont les concurrents de Promethera ?

Oui il y en a d'autres mais nous sommes actifs dans deux indications médicales mais on cherche également des solutions pour d'autres indications. Le principe est que le patient manque une enzyme et nos cellules seront capables de créer ces enzymes. Il suffit donc que les cellules produisent les bonnes enzymes pour pouvoir guérir plusieurs maladies.

Quel test de *release* utilisez vous ?

Nous utilisons caryotype et cela est sous-traité en Belgique et en France. Nus avons également tester en faisant plusieurs passages de cellules et avons fait de l'analyse de sénescence.

Si nous commercialisons nos tests seriez-vous intéressés de les obtenir et les utiliser ?

Oui bien sur, surtout si c'est plus rapide que le caryotypage. Mais comme nous faisons ça pour les agences de régulations il faut que cela soit accepté comme alternative. Comme ces nouveaux on pourrait être prêt à vous accompagner et en parler aux autorités qui sont relativement à l'écoute grâce à la nouveauté du secteur. Ils savent que de nouvelles solutions peuvent apparaître qui seraient plus adapté à ce secteur.

Stratégie de distribution ? Test réalisé dans nos laboratoires ? Un de nos scientifiques dans vos laboratoires ? Sous forme de kit ?

De notre coté il n'y a pas de soucis de transport, nous travaillons avec BPL et nos cellules son cryopréservées donc pas de soucis. Il est clair que la proximité est pratique mais si jamais vous êtes plus loin ce n'est pas non plus rédhibitoire. Pas de soucis pour scientifiques mais alors besoin de signer NDA et NCA. Le mieux c'est que le développement du produit soit fait par vous et montrer que c'est acceptable avec nos cellules alors après il est possible de passer par kit qui est une forme plus pratique. Kit, il faut que ce soit rapide, facile d'utilisation en laboratoire

Hôpitaux, potentiels client à vos yeux ?

Oui, sûrement par ce que nous faisons tout en routine mais en clinique c'est souvent des cellules des patients ils doivent tester tout le temps et ne sont jamais certains de leurs développement et de la sécurité de leur procédure.

Conseils ou suggestions en conclusion ?

Pour moi ce serait important de prendre contact avec les autorités et agences. Les entreprises de thérapie cellulaire font ces tests de *release* car c'est demandé par les autorités de régulations. Vérifier que les tests puissent être fait à partir d'un nombre de cellules pas trop grand et plus simple si on peut travailler pour les tests avec des cellules sous forme cryo-préservées. Ce qui facilite le transport et le stockage du matériel cellulaire.

B.2.6 UCB

Jean-François Decoster, *Associate Director, Head of Primary Packaging Development Manager* - 20 janvier 2016

Scancell : Notre projet s'inscrit dans le cadre de la thérapie cellulaire. Avant de pouvoir injecter les cellules manipulées il faut faire certaines analyses, notamment un contrôle qualité et vérifié que les cellules injectées ne contiennent pas de cellules cancéreuses. Nous proposons des tests détectant ces cellules cancéreuses.

Ce n'est pas un médicament. Ce n'est donc pas domaine direct mais je peux vous aider en effet.

La forme de kit nous plaît et nous nous demandions si selon vous cela semble possible. L'échantillon est destructif et après l'échantillon ne peut donc pas être utilisé. Savoir si c'est faisable ? Consommables protégés dans ceux qu'on utilise.

Tout ce qui est protégé par brevet cela ne pose pas de problème et doit passer par un accord avec le détenteur du brevet. Sauf si le brevet ne couvre pas cet application là et qu'on trouve une faille. Il faut voir ce que ce brevet recouvre. Peut-être que le brevet ne le couvre pas.

Les tests qu'on utilise se basent sur la PCR et même les amorces sont protégées. C'est un procédé de fabrication qui est protégé.

Il faut aller leur poser la question. Construire cela avec un expert juridique en ce genre de négociation et qui pourra vous dire ce qui est faisable.

Cela se fait relativement rapidement dans votre secteur ?

Oui, tout à fait les licences, etc se donnent régulièrement et souvent.

Nous faisons un package de trois tests de PCR basé sur une théorie scientifiquement prouvée. Possible de mettre les 3 tests au sein d'un même kit ?

Si tout est bien identifié et que la notice explique clairement aux scientifiques que faire et dans quel ordre. Il n'y a aucune raison que le scientifique se trompe. Il faut faire un travail d'explication d'utilisation précis. Parfois il faut comprendre comment l'ouvrir, comment les utiliser etc. C'est important de donner les manipulations précises.

Obligations légales ?

Ce n'est pas quelque chose que le patient va devoir tester lui-même. Donc c'est moins règlementé que ce qui est directement considéré comme un médicament. Il faut soumettre un dossier aux agences de santé. En fonction de la zone géographique sur laquelle vous allez vous développer. Il va falloir prouver que le produit est toujours efficace jusqu'à autant de mois. Il y a les guidances de l'ICH qui expliquent comment faire pour la qualité des produits de santé, dont une pour la stabilité des nouveaux produits. C'est un vérificateur. Recommande des conditions de stockage, le nombre de mois minimum à tester, etc.

On se posait la question, si on avait un avantage à produire les kits nous même ou bien sous-traiter ?

Je pense que le moment où le produit devra être autorisé il faudra une autorisation pour produire ce genre de chose et il faudra toutes la sécurité, comment conditionné, comment sont produits les kits. Est-ce qu'il faut une personne responsable qui va vérifier que tout a été produit conformément à tout ce qui a été prévu avec les autorités. Dans le cadre de diagnostic cela n'atteint probablement pas le même niveau d'exigence. Il faut être agréé pour la production en GMP, etc. C'est faisable mais cela peut coûter cher et il faut s'entourer d'experts et consultants qui peuvent aider. Il y a les aspects financier et temps qui sont important si vous partez de rien. L'avantage d'aller chez un sous-traitant qui a l'habitude de faire ce genre de chose il aura déjà toutes les structures mises en places. Cela dépend de la production qui sera nécessaire.

D'un point de vue coordination avec le sous-traitant est-ce que vous savez comment cela se passe ? Le sous-traitant a des exigences en général ?

Il faut mettre en place les accords de sous-traitances et contrat de confidentialité. Il faut travailler également sur un quality agreement dans lequel on définit qui sera responsable de quoi, comment devons être produit les kits. Tout ça doit être défini avant de commencer la relation. Il faut également prévoir tout ce qui est pénalité, qui est responsable financièrement si jamais des kits doivent être détruits. Il faut vérifier qu'ils soient capables de répondre à nos demandes de production.

Du côté d'UCB comment cela se passe t'il ?

On a différentes stratégies en fonction des produits. On fait de l'interne, parfois on externalise également le tout et pour certains de nos produits on a tant de l'interne que de l'externe.

Pour vous, au quotidien, ce côté packaging primaire qu'est ce que cela implique ?

Cela comprend énormément de choses. Cela dépend des molécules et de leur résistance à l'oxygène ou à l'humidité. Optimiser l'emballage. Il y a également des médicaments qui doivent rester stérile, vérifier les composants et leurs réactions avec le produit. Vérifier aussi que tout ce qui est dans le produit et qui peut être extrait, il ne faut pas qu'il y ait quelque chose qui soit nocif ou toxique pour le patient.

Y a-t-il une durée moyenne pour l'ensemble du processus de fabrication du packaging ?

C'est défini. Maintenant le développement de l'emballage c'est en parallèle avec le développement du produit et souvent on a le temps vu que les phases cliniques prennent du temps. On n'a pas de délai bien précis. Une fois que le développement est fait, la production est automatisée et on sait quel kit prend combien de temps à être produit. Si vous allez chez un sous-traitant il pourra vous dire quel délai est raisonnable. Il y a la partie opérationnelle de la fabrication du kit mais également tout ce qui est documentation. Partie assurance qualité qui doit revoir la documentation et vérifier que tout a été produit conformément à ce qui est prévu. Si jamais il y a eu un problème il faut évaluer l'impact de cette déviation. En tout cas c'est comme cela pour les médicaments

Coût moyen de la fabrication d'un kit ?

Cela dépend des matériaux, de la quantité que vous allez produire, etc. Le volume est important et le chiffre peut varier en fonction. Cela peut passer du simple à dix fois plus cher. Pour démarrer une activité comme ça c'est très ambitieux, il vaut mieux d'abord commencer par sous-traiter même si le prix d chaque lot revient plus cher, il y a une économie d'investissement au début qui est vraiment important.

B.3 Liste des entreprises belges de thérapie cellulaire

Tableau B.1 – Liste des entreprises développant ou effectuant la QA de leurs produits en Belgique, et portefeuille de produits principaux avec phase d’essai clinique la plus avancée (Site internet des entreprises). N/A : non applicable.

ENTREPRISE	PRODUIT	TYPE	ESSAIS CLINIQUES
<i>Celyad</i>	C-Cure	Autologue	Phase III
	Oncyte	Allogénique	Phase I/IIa
<i>Bone Thera- peutics</i>	Préob	Autologue	Phase IIb/III
	Allob	Allogénique	Phase I/IIa
<i>Promethera</i>	Hepastem	Allogénique	Phase IIb
<i>Tigenix</i>	Chondroselect	Autologue	Commercialisé
	CX 601	Allogénique	Phase III
	CX 611	Allogénique	Phase IIa
<i>Beta-cell</i>	Beta-Graft	Autologue	Phase I
<i>Novadip</i>	Creost	Autologue	IIa
<i>ERC</i>	Gliovac	Autologue	Phase IIa
<i>Txcell</i>	Ovasave	Autologue	Phase IIb
<i>Imcyse</i>	N/A	Autologue	I-IIa
<i>Athersys</i>	Multistem	Allogénique	Phase IIb
<i>Regenesys</i>	Xeno-free Multistem	Allogénique	Phase I-IIa
<i>The Cell Factory</i>	N/A	Autologue	Phase I
<i>Genzyme</i>	N/A	N/A	Recherche

B.4 Liste des établissements belges autorisés pour l'utilisation de MCH

Tableau B.2 – Liste des établissements belges de matériel corporel humain agréés (AFMPS 2015) :

ETABLISSEMENT	LIEU
<i>Cryo-save</i>	Niel
<i>Tigenix</i>	Leuven
<i>Celyad</i>	Mont-Saint-Guibert
<i>Bone Therapeutics</i>	Anderlecht
Universitair Ziekenhuis Leuven	Leuven
Universitair Ziekenhuis Gent	Gent
Vrij Universiteit Brussel	Jette
Universitair Ziekenhuis Antwerpen	Antwerpen
Institut Jules Bordet	Bruxelles
Cliniques universitaires Saint Luc	Woluwe Saint Lambert
Clinique du Sud Luxembourg	Arlon
CHU de Liège	Liège
Rode Kruis – Vlaanderen	Gent
Virga Jesseziekenhuis	Hasselt
Heilig Hartziekenhuis	Roeselaere
Hopital de Jolimont-Lobbes	Haine Saint-Paul
ZNA Campus Stuivenberg	Antwerpen
AZ Sint Jan AV	Brugge
CHU Mont-Godinne	Yvoir
Grand Hôpital de Charleroi	Charleroi
Ziekenhuis Maas en Kempen	Maaseik
Sint-Jozefskliniek	Izegem
Sint-Franciskus Ziekenhuis	Heusden-Zolder
RZ St.-Trudo	Sint-Truiden
RZ St.-Maria	Halle

Mariaziekenhuis Overpelt	Overpelt
OLV Ziekenhuis	Aalst
OLV van Lourdes Ziekenhuis	Waregem
Laboratoire d'analyses médicales de Thuin	Thuin
Laboratoire CEBIODI	Bruxelles
Labo Nuytinck	Gent
Labo Lokeren	Lokeren
Jan Yperman ziekenhuis	Ieper
AZ Vesalius	Tongeren
AZ Turnhout	Turnhout
AZ St.-Elisabeth	Zottegem
AZ St.-Augustinus	Veurne
AZ Groeninge	Kortrijk
AZ Diest	Diest
Algemeen stedelijk ziekenhuis	Aalst
Algemeen medisch laboratorium	Antwerpen
Algemeen klinisch labo	Lier
Imelda ziekenhuis	Bonheiden
GZA ziekenhuis	Wilrijk
Cliniques de l'Europe	Uccle
Clinique Saint-Pierre	Ottignies
CHWAPI	Tournai
CHU Charleroi	Lodelinsart
CHU Ambroise Paré	Mons
CHIREC – Edith Cavell	Uccle
AZ St.-Lucas	Gent

AZ Nikolaas	Sint-Niklaas
AZ KLINA	Brasschaat
ZNA Antwerpen	Antwerpen
Ziekenhuis Oost-Limburg	Genk
CHR de Namur	Namur
CHR de la Citadelle	Liège
CHIREC – Waterloo	Braine l’Alleud
CHC – Clinique Saint Vincent	Liège
CHA – Vivlia	Libramont
AZ Jan Palfijn	Gent
Hopital militaire Reine Astrid	Neder-Over-Hembeek

B.5 Liste des laboratoires de recherche de thérapie cellulaire

Tableau B.3 – Liste des laboratoires de recherche de thérapie cellulaire (AFMPS 2015).

LABORATOIRE	UNIVERSITÉ/HÔPITAL
Laboratory for Molecular and Cellular Therapy (LMCT)	Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratoire de Thérapie Cellulaire Clinique (LTCC)	Université Libre de Bruxelles (ULB), Institut Julien Bordet
Laboratoire de neurologie expérimentale	ULB
Stem Cell Institute (SCIL)	Katholieke Universiteit Leuven (KU Leuven)
Laboratory of Molecular Virology and Gene Therapy	KU Leuven
Center for Transgene Technology and Gene Therapy (CTG)	KU Leuven, VIB Vesalius Research Center
Laboratory for Neurobiology and Gene Therapy	KU Leuven
Center for Cell Therapy and Regenerative Medicine	Antwerp University Hospital
Laboratory of Cell and Gene Therapy (LTCG)	Université de Liège (ULg), CHU
Laboratory of Pediatric Hepatology and Cell Therapy	Université Catholique de Louvain (UCL)
URPHYM (Research Institute for Life Sciences)	Université de Namur (UNamur)

B.6 Liste des concurrents et entrants potentiels

Tableau B.4 – Menace concurrentielle : technologie principalement développée (information publique des entreprises)

CATÉGORIE	ENTREPRISE	INTENSITÉ DE LA MENACE
Concurrent direct	<i>Roche</i>	Kit activité télomérase
	<i>Belgian Volition</i>	Dépistage du cancer, basé sur l'épigénétique
	<i>MdxHealth</i>	Dépistage du cancer, pronostic du risque de récurrence et prédiction de la réponse à un traitement
Concurrent indirect	<i>Diagenode</i>	Séquençage
	<i>DNAvision</i>	Séquençage
	<i>Cell BioLabs</i> (Distributeur belge : Bio-Connect)	Soft agar
	<i>IPG</i> (Institute of Pathology and Genetics)	Caryotype
	<i>Biocartis</i>	Séquençage
	<i>DNAlytics</i>	Développements de tests sur mesure et analyses sur ADN
Entrant potentiel	<i>ImmuneHealth</i>	Services analytiques et partenaire de la thérapie cellulaire
	<i>AnaBioTec</i>	Services analytiques
	<i>Biogazelle</i>	Services analytiques
	<i>Diagenode</i>	Analyses chromatine, analyses de méthylation de l'ADN et analyses protéiques

<i>Delphi genetics</i>	Services liés aux gènes
<i>DNAvision</i>	Profils d'expression de gènes
<i>Eurofins Scientific</i>	Services analytiques
<i>NXT-Dx</i>	Services analytiques en épigénétique, transcriptomique et protéomique
<i>Quality Assistance</i>	Services analytiques et partenaire de la thérapie cellulaire
<i>Biocartis</i>	Diagnostic moléculaire
<i>SGS Life Sciences</i>	Services analytiques



Curriculum vitae

C.1 Charlotte Bertrand



**Charlotte
BERTRAND**

*Biochimie et Biologie Moléculaire et
Cellulaire*

CHIEF TECHNOLOGY AND OPERATING OFFICER

Drève des Deux
Bois, 19
1490 Court-Saint-
Etienne

Tél.
0479 61 14 20

Email
chabertrand
@hotmail.com

Née le 08/02/1993



Formation

2014 – en cours • **Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire**
Université catholique de Louvain
Formation en création de petites et moyennes entreprises (CPME)

2011 – 2014 • **Bachelier en Sciences biologiques**
Université catholique de Louvain
Mineure en Biochimie et Biologie Moléculaire et cellulaire

2011 • **Certificat d'enseignement d'études supérieures**
Collège du Christ-Roi Ottignies
Option Sciences fortes



Expériences

2015 – en cours • **Stagiaire en Recherche & Développement • Celyad**
Développement de tests de détection de cellules tumorales

Novembre – Décembre 2014 • **Stagiaire en biologie appliquée • Université catholique de Louvain**
Gènes Hox, toxicité de nanoparticules d'argent et bactériologie

Juillet 2013 • **Stagiaire en biologie environnementale • Université de Namur**
Analyses toxicologiques chez *Oncorhynchus mykiss* et *Danio rerio*

Mars 2012 • **Stagiaire d'observation • UCB Pharma**
Suivi de la chaîne de production d'un médicament biologique



Compétences

Linguistiques

Anglais

★★★★★

Néerlandais

★★★

Français (langue maternelle)

★★★★★

Informatiques

Word, Excel, PowerPoint (ou équivalents), SAS Entreprise



Centres d'intérêt

Kin-ball

Capitaine et gestionnaire du club de Jodoigne (2003 – 2014)

Entrepreneuriat

Projets *Scancell* et *Geoshop* (application de shopping géolocalisée)

C.2 Antoine Logé



Antoine
LOGÉ

Droit

CHIEF LEGAL OFFICER

Rue du Long
Pont, 1
1360 Perwez

Tél.
0495 25 49 15

Email
antoineloge
@gmail.com

Née le 16/06/1993



Formation

2014 – en cours • **Master en Droit**

Université catholique de Louvain

Formation en création de petites et moyennes entreprises (CPME)

Erasmus : Université de Montréal (2015)

2011 – 2014 • **Bachelier en Droit**

Université catholique de Louvain

Mineure en approfondissement en Droit

2011 • **Certificat d'enseignement d'études supérieures**

Collège Saint-Hubert

Option Latin - Sciences fortes

Echange : Springbank High School – Canada (Avril- Mai 2009)



Expériences

2012 – 2015 • **Tutor adept** • Université catholique de Louvain

Conseils et encodage de données

2015 • **Réassortisseur** • Igor Home (5 mois)

Livraisons et réapprovisionnement de marchandises

2013 – 2014 • **Stagiaire juridique** • Brussels Financial Services (8 jours)

Rédaction de solution en Droit des Sociétés

2010 - 2014 • **Sales assistant** • Cash Converters

Vente et conseils à la clientèle



Compétences

Linguistiques

Anglais

★★★★★

Néerlandais

★★★★★

Français (langue maternelle)

★★★★★



Centres d'intérêt

Projets sociaux

Chef d'un camp Enfants du Juge – Ordre de Malte (2014 – en cours)

Location de matériel de paintball – ASBL l'Arche de Marie (2012 – 2015)

Coach de hockey – Lara et Wellington Hockey Club (2009 – 2014)

Participation au Rallye 4L Trophy (2013)

Projets personnels

Hockey – Tennis – Lecture – Voyages

C.3 Robin Pétré



Robin
PETRE

Ingénieur de Gestion

CHIEF FINANCING OFFICER

Rue de la
Cueillette, 50
1180 Uccle

Tél.
0472 369 312

Email
robin
@maisonpetre.be

Née le 18/05/1993



Formation

- 2014 – en cours • **Master en Ingénieur de Gestion**
Université catholique de Louvain
Formation en création de petites et moyennes entreprises (CPME)
Erasmus : *Dalhousie University* – Canada (2015)
- 2011 – 2014 • **Bachelier en Ingénieur de Gestion**
Université Saint-Louis Bruxelles
Majeure trilingue (Français – Anglais – Néerlandais)
Erasmus : *Universidad de Sevilla* – Espagne (2013)
- 2011 • **Certificat d'enseignement d'études supérieures**
Institut Saint-Boniface Parnasse
Option Latin - Mathématiques fortes



Expériences

- 2011 – en cours • **Sales assistant** • Pierre Marcolini (1x par semaine)
Vente et conseils à la clientèle
- 2014 – en cours • **Chef scout trésorier** • 95^{ème} Tison Ardent
Gestion de troupe et comptabilité
- 2014 – 2015 • **Kot-à-projet** • Le Kap Délices
Promotion de la « bonne nourriture » dans le milieu étudiant
- 2010 - 2011 • **Administrateur délégué** • Mini-entreprise Sweet Creams
Esprit d'équipe et simulation d'entreprise



Compétences

Linguistiques

<i>Anglais</i> (IELTS 7.0)	★★★★★
<i>Espagnol</i>	★★★★★
<i>Néerlandais</i>	★★★★
<i>Français</i> (langue maternelle)	★★★★★



Centres d'intérêt

Volontariat

- Encodage de résultats – RCBT (2013 – en cours)
Responsable d'un Jeune Magasin – Oxfam (2008-2011)

Sports

- Champion de Belgique Espoirs de Run&Bike (2014)
Obtention du titre d'Arbitre régional de tennis – AFT Brabant (2006)

Annexes juridiques

Brouillon de dépôt de brevet

Ce document est le fruit du travail réalisé dans le cadre du cours de l'UCL SC3001 - *Recherche, innovation et propriété intellectuelle : application au secteur de la chimie et sciences de la vie*, et comprend une analyse d'antériorité et de brevetabilité de notre produit. Sont également comprises des revendications liées au dépôt d'une demande de brevet.

Certaines informations, inconnues à l'époque, peuvent ne pas correspondre à la réalité mais ont été définies à titre indicatif.

ABREGE

La présente invention est un kit de détection *in vitro* des cellules tumorales, combinant l'analyse des cellules télomérase-positives (expression et activité de hTERT) et ALT-positives (détection de mutations spécifiques et mesure de la longueur des télomères) grâce à quatre méthodes analytiques. Ce kit fournit un résultat complet et présente une haute sensibilité, ce qui garantit donc un résultat plus fiable que les méthodes actuelles d'évaluation de la tumorigénicité.

Par ce document, nous posons une requête de délivrance de brevet pour l'invention décrite ci-dessous.

I. Domaine de l'invention

L'invention décrite dans ce document s'inscrit dans le domaine des biotechnologies. Il s'agit d'un kit de détection *in vitro* des cellules tumorales, basé sur la combinaison de quatre méthodes analytiques.

La détection *in vitro* des cellules tumorales peut être évaluée pour des raisons diverses, telles que le développement d'un médicament anti-cancéreux (*drug discovery*), la sécurité des traitements basés sur l'injection de cellules modifiées (thérapies cellulaire et génique) ou encore en recherche fondamentale.

II. Problème

Actuellement, quatre méthodes existent pour détecter les cellules tumorales *in vitro* : le caryotype, les méthodes de formation de colonies (*soft agar*), la cytométrie de flux et le séquençage. Ces tests présentent deux inconvénients majeurs :

- Ils fournissent un résultat incomplet, car ils se basent sur des mécanismes non-universels de tumorigénicité (c'est-à-dire des caractéristiques qui ne sont pas présentes chez toutes les cellules tumorales) ;
- Ils sont peu sensibles, ce qui signifie qu'un échantillon doit contenir un nombre important de cellules tumorales pour que le test génère un résultat positif. Ce désavantage est applicable au caryotype (sensibilité de 10%) et au *soft agar* (sensibilité de 12,5%).

Ainsi, ces quatre méthodes génèrent une quantité non négligeable de faux négatifs et ne sont donc pas entièrement fiables. Notre invention répond à cette problématique, car elle consiste en un kit de détection *in vitro* des cellules tumorales basé sur l'utilisation combinée de quatre méthodes analytiques reposant toutes sur un **mécanisme universel de tumorigénicité** – l'immortalité répliquative – et possédant une **haute sensibilité**. Les quatre tests de notre kit sont la mesure de l'expression de la télomérase, la mesure de l'activité de la télomérase, la détection des mutations spécifiques à ALT et la mesure de la longueur des télomères.

III. Art antérieur

Pour établir la nouveauté, une analyse de l'état de la technique a été réalisée. Pour chacun des tests contenus dans notre invention/kit, les documents pertinents (demande de brevet, brevet ou article scientifique) ont été identifiés et cités.

- **Mesure de l'expression de la télomérase**

Derveaux S, Vandessompele J, Hellemans J (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods 50

Comme en témoigne l'article cité ci-dessus, la mesure de l'expression d'un gène par RT-QPCR fait partie de l'état de la technique depuis plusieurs années et est connue par tout homme du métier. Cependant, il existe une grande variabilité en ce qui concerne les paramètres utilisés dans une réaction de RT-QPCR.

- **Mesure de l'activité de la télomérase**

US6221584 (B1) – Method of detecting telomerase activity

Ce document-brevet présente la technique telle qu'utilisée dans notre kit pour mesurer l'activité de la télomérase. Aucune modification majeure n'a été apportée au protocole pour notre invention. Le brevet a été décerné aux Etats-Unis, en Europe, au Japon et en Australie.

- **Détection des mutations spécifiques à ALT**

Morlan J, Baker J, Sinicropi D (2009). Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. PLoS ONE 4(2)

Selon les bases de données Espacenet et CPC, aucune demande de brevet n'a été effectuée pour la méthode de détection des mutations ponctuelles par ASB-QPCR. Cependant, cette technique est décrite dans la littérature scientifique, comme en témoigne l'article cité ci-dessus. La nouveauté de ce test réside donc dans l'application qui est faite de cette technique, puisque nous l'utilisons comme test d'identification des cellules ALT-positives, sur base de l'identification de mutations corrélées au phénotype ALT.

- **Mesure de la longueur des télomères**

EP2379747 (B1) - Monochrome multiplex quantitative PCR

La technique QPCR multiplex monochrome est décrite dans ce document-brevet, dont Richard Cawthon est l'inventeur. Dans la description, son utilisation pour mesurer la longueur des télomères est évoquée. Une fois encore, nous innovons dans l'application qui est faite de ce test, en l'utilisant comme test d'identification des cellules ALT-positives, sur base de l'expérience que les cellules ALT-positives ont une longueur moyenne des télomères plus élevée (20 kb).

L'analyse de l'art antérieur a ainsi permis de déterminer que les quatre méthodes contenues dans notre kit se basent sur des principes qui sont connus de l'état de la technique, comme en témoignent les documents présentés ci-dessus. La **nouveauté** de cette invention réside donc en :

- l'**application** qui est faite de certaines de ces techniques. Ceci est valable pour les tests concernant le mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT) ;
- la **combinaison** des quatre tests, qui n'est décrite nulle part dans l'état de la technique et, surtout, qui fait tout l'intérêt et la fiabilité de notre kit.

IV. Description

IV.1. Domaine technique

Les télomères sont des structures spécialisées qui protègent l'extrémité des chromosomes. Plus précisément, il s'agit d'une séquence désoxyribonucléique constituée d'un grand nombre de répétitions (le « bloc » de répétition étant 5'-TTAGGG-3').

A chaque division de la cellule, les télomères se raccourcissent suite à l'action de la machinerie de réplication de l'ADN. Après un certain nombre de divisions, les télomères atteignent une longueur critique, ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire. Autrement dit, la cellule ne se divise plus ; on parle alors de sénescence répliquative. Afin de se diviser de manière indéfinie, les cellules tumorales contournent la sénescence répliquative en utilisant deux mécanismes d'allongement des télomères :

- la télomérase hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), enzyme chargée de la synthèse d'ADN aux extrémités télomériques sur base d'un guide d'ARN ;
- un mécanisme alternatif, appelé *alternative lengthening of telomeres* ou ALT, qui repose sur la recombinaison homologue entre deux séquences télomériques.

Grâce à ces deux mécanismes, les télomères des cellules tumorales gardent une longueur constante (puisque leur raccourcissement est compensé par leur rallongement à chaque division). Ces cellules se divisent donc de manière illimitée et n'entrent jamais en sénescence ; on parle alors d'immortalité répliquative. L'immortalité répliquative est une caractéristique présente chez toutes les cellules tumorales et une étape inévitable lors du processus de tumorigenèse.

IV.2. Description détaillée de l'invention

Comme évoqué précédemment, notre invention est un kit de détection *in vitro* des cellules tumorales. Il est composé de deux méthodes de **détection des cellules télomérase-positives** :

- « Mesure de l'expression de la télomérase » ;
- « Mesure de l'activité de la télomérase ».

ainsi que de deux méthodes de **détection des cellules ALT-positives** :

- « Détection des mutations spécifiques à ALT » ;
- « Mesure de la longueur des télomères ».

Chaque méthode peut être utilisée indépendamment des autres. Cependant, le résultat fourni par chaque test est incomplet, car il concerne l'analyse respective d'un seul aspect de l'immortalité répliquative. Chaque test, utilisé individuellement, ne répond donc pas à la problématique énoncée au début de cette demande de brevet. Les quatre tests de notre kit sont hautement sensibles et complémentaires puisqu'ils permettent de couvrir tous les mécanismes connus d'allongement des télomères. Leur combinaison est donc indispensable pour fournir un résultat fiable quant à la présence ou à l'absence de cellules tumorales au sein d'un échantillon (un exemple pratique est présenté en annexe). Mentionnons que cette combinaison ne consiste pas en une simple juxtaposition, mais bien en une analyse concertée ayant pour but de confirmer ou d'infirmer la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire.

- **Mesure de l'expression de la télomérase**

La Figure 1 (présentée en annexe) montre le principe de ce test. La RT-QPCR, telle que nous l'avons appliquée pour mesurer l'expression de la télomérase, consiste en :

- (a) l'extraction d'ARN à partir d'un échantillon cellulaire ;
- (b) la rétro-transcription de l'ARN en ADNc ;

(c) l'amplification du gène de la télomérase (hTERT), ainsi que d'un gène de référence dont le niveau d'expression est stable (par exemple, la cyclophiline A).

Dans notre test, les étapes (b) et (c) ont lieu successivement, au sein d'une même réaction. Cela est possible grâce à l'utilisation du mix de réaction contenu dans le kit « LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes » de Roche¹. Pour l'amplification de hTERT, les amorces et la sonde font partie d'un mix commercialisé par Applied Biosystems² et qui peut être utilisé à des concentrations allant de 300nM à 5µM (concentration préférentielle : 900nM). Pour l'amplification de la cyclophiline A, les amorces (SEQ ID No. 1 ; SEQ ID No. 2) et la sonde (SEQ ID No. 3) sont issues de notre expertise. Les amorces peuvent être utilisées à des concentrations allant de 300nM à 5µM (concentration préférentielle : 900nM) et la sonde à des concentrations allant de 100nM à 400nM (concentration préférentielle : 200nM).

SEQ ID No. 1 : 5'-GACGTAATGCGTCAGTACGTA-3'

SEQ ID No. 2 : 5'-CTTAGCTAATCGGATTAAACC-3'

SEQ ID No. 3 : 5'-TEX65-GATGCGTAGGGCCCTAGCTAGAGCGATCGT-BHQ²-3'

Le programme de cycles thermiques ainsi utilisé dans ce test est le programme décrit dans le manuel du kit « LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes » pour l'utilisation du LightCycler 480 96-puits ([Handbook disponible en ligne \[cliquer ici\]](#), page 6).

Une étude au sein de nos laboratoires a mené à la conclusion que ce test est spécifique et que sa sensibilité est de 1% en terme de MG-63 et de 0,25% en terme de HT1080 et de A549.

- **Mesure de l'activité de la télomérase**

La Figure 2 (présentée en annexe) montre le principe de ce test. Il est réalisé comme expliqué dans le brevet qui concerne cette invention (**US6221584 (B1)**). La technique utilisée est celle décrite dans la **version 4** de ce brevet, c'est-à-dire où le produit d'amplification PCR est immobilisé sur une phase solide grâce à la présence d'une biotine en 5' d'une amorce télomérique et où la détection est réalisée grâce à une sonde couplée à la digoxygénine. Notre expertise a permis de déterminer que ce test est spécifique et que sa limite de détection est de 0,25% en terme de HT1080 et de MG-63 et inférieure à 0,1% en terme de A549.

- **Détection des mutations spécifiques à ALT**

La Figure 3 (présentée en annexe) montre le principe de ce test. Plusieurs mutations ponctuelles de *tp53* (R175H, R248W, R248Q, R273H, R273C), *idh1* (R132H), *h3f3a* (K27M, G34R et G34V) et *atrx* (R123H, K165M) sont détectées selon les modalités d'une technique d'ASB-QPCR publiée dans la littérature scientifique (**Morlan et al, 2009**). Ces gènes ont été sélectionnés grâce à l'analyse de données présentes dans des études publiées ainsi que dans des bases de données en ligne. Le *design* des amorces et des sondes pour chaque gène muté (pour *tp53* : SEQ ID No. 4, 5 et 6 ; pour *idh1* : SEQ ID No. 7, 8 et 9 ; pour *h3f3a* : SEQ ID No. 10, 11 et 12 ; pour *atrx* : SEQ ID No. 13, 14 et 15) est propre au test que nous avons développé. Les amorces de chaque gène muté sont utilisées à des concentrations similaires à celles décrites dans l'article.

La réaction de QPCR est réalisée en multiplex bichromatique, puisqu'un gène de référence – l'albumine (SEQ ID No. 16, 17 et 18) – est également amplifié en guise de contrôle interne. Les amorces de l'albumine peuvent être utilisées à des concentrations allant de 300nM à 5µM (concentration préférentielle : 900nM). Les sondes, pour les gènes mutés comme pour l'albumine, peuvent être utilisées à des concentrations allant de 100nM à 400nM (concentration préférentielle : 200nM).

¹ Cat. No. : 04991885001

² Cat. No. : Hs00162669-m1

SEQ ID No. 4 : 5'-CTGAAGATCAGATCAGATGTA-3'
 SEQ ID No. 5 : 5'-CACCCGTACGATCA-3'
 SEQ ID No. 6 : 5'-FAM-CGAACATCGCACTTTACGACTACGACCGATCA-BHQ¹-3'
 SEQ ID No. 7 : 5'-AATCGTCAGGCAACTCACG-3'
 SEQ ID No. 8 : 5'-CCGACGCATCGACGA-3'
 SEQ ID No. 9 : 5'-FAM-GCCCAATCAGCATACGATCACATGACAGTACCTACAGA-BHQ¹-3'
 SEQ ID No. 10 : 5'-GGCATCCCATCGATCAC-3'
 SEQ ID No. 11 : 5'-CCGACCTACCAGCCAGCA-3'
 SEQ ID No. 12 : 5'-CCATGCCAGCGACTACGTTACCGGAACTACAGCAGACCAT-BHQ¹-3'
 SEQ ID No. 13 : 5'-GCCACAATCCCTTGGACT-3'
 SEQ ID No. 14 : 5'-AAACTCGTACGGCATC-3'
 SEQ ID No. 15 : 5'-FAM-GGCACTCACCCAGCCAGCTACGAACAAATT-BHQ¹-3'
 SEQ ID No. 16 : 5'-GGATAGACCGATCAAGTCA-3'
 SEQ ID No. 17 : 5'-CCATCCATGACATGACTATCA-3'
 SEQ ID No. 18 : 5'-TEX65-CCAGTACCGCCTACGCAAAACGTACCGACTACCACGA-BHQ²-3'

Le mix de la réaction de QPCR utilisé est celui contenu dans le kit « LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes ». Cette technique peut être utilisée sur de l'ARN comme sur de l'ADN, tous les deux extraits à partir d'un échantillon cellulaire (utilisation préférentielle de l'ADN génomique).

Grâce à notre expertise, nous avons défini que ce test est spécifique et qu'il possède une sensibilité de 1% en terme de U2OS et de 0,75% en terme de VA13.

- **Mesure de la longueur des télomères**

La Figure 4 (présentée en annexe) montre le principe de ce test. La technique de mesure de la longueur des télomères utilisée est celle décrite dans le brevet **EP2379747 (B1)**. Elle est ici appliquée en tant que test d'identification des cellules ALT-positives, pour lesquelles il a été déterminé que le ratio T/S devait être compris dans l'intervalle $4,32 \pm 0,35$ (comparé à $1,56 \pm 0,98$ pour une cellule ALT-négative). Un travail expérimental a également permis de déterminer que ce test est spécifique et que sa limite de détection est de 5% en terme de U2OS.

En plus d'être nouvelle, la combinaison de ces quatre tests fait preuve d'**activité inventive**, puisqu'elle n'est pas évidente aux yeux d'un homme de métier. Il existe en effet plusieurs méthodes pour identifier les cellules télomérase-positives et ALT-positives. D'autres combinaisons ont été analysées et ne montrent la même fiabilité. Donc, la sélection de ces quatre méthodes et leur combinaison au sein de notre kit sont le fruit d'un travail comparatif basé sur l'expérimentation et réalisé au sein de nos laboratoires.

V. Revendications

Par la liste suivante, nous revendiquons :

1. **Combinaison** d'une méthode de mesure de l'expression de la télomérase, d'une méthode de mesure de l'activité de la télomérase, d'une méthode de détection des mutations spécifiques à ALT et d'une méthode de mesure de la longueur des télomères pour l'évaluation de la tumorigénicité d'un échantillon cellulaire (*in vitro*)
 - 1.1. Combinaison selon la revendication 1, où la mesure de l'expression de la télomérase est réalisée par RT-QPCR
 - 1.2. Combinaison selon la revendication 1, où la mesure de l'activité de la télomérase est réalisée par succession d'une réaction TRAP et d'un ELISA
 - 1.3. Combinaison selon la revendication 1, où la détection des mutations spécifiques à ALT est réalisée par ASB-QPCR
 - 1.4. Combinaison selon la revendication 1, où la mesure de la longueur des télomères est réalisée par QPCR
2. **Combinaison** de la détection des mutations spécifiques à ALT et de la mesure de la longueur des télomères pour l'identification des cellules ALT-positives
3. **Combinaison** de la mesure de l'expression de la télomérase et de la détection des mutations spécifiques à ALT pour la détection des cellules tumorales *in vitro*
4. **Combinaison** de la mesure de l'expression de la télomérase et de la mesure de la longueur des télomères pour la détection des cellules tumorales *in vitro*
5. **Combinaison** de la mesure de l'activité de la télomérase et de la détection des mutations spécifiques à ALT pour la détection des cellules tumorales *in vitro*
6. **Combinaison** de la mesure de l'activité de la télomérase et de la mesure de la longueur des télomères pour la détection des cellules tumorales *in vitro*
7. **Méthode** de mesure de l'expression de la télomérase par RT-QPCR caractérisée en ce que la réaction de QPCR est multiplex bichromatique
 - 7.1. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que le contrôle interne est le gène de la cyclophiline A
 - 7.2. Méthode selon la revendication 7, où les amorces de hTERT et de la cyclophiline A peuvent être utilisées à des concentrations allant de 300nM à 5µM, et les sondes à des concentrations allant de 100nM à 400nM
 - 7.3. Méthode selon la revendication 7, où le mix de la réaction de QPCR provient du kit « LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes » de Roche
8. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification par QPCR du gène de la cyclophiline A (SEQ ID No. 1-3)
9. Technique de détection des mutations ponctuelles par ASB-QPCR pour **utilisation** en tant que test d'identification des cellules ALT-positives
 - 9.1. Technique utilisée selon la revendication 9, où la réaction de QPCR est multiplex et bichromatique
 - 9.2. Technique utilisée selon la revendication 9, où les mutations ponctuelles des gènes *tp53*, *idh1*, *h3f3a* et *atrx* sont au minimum analysées

- 9.3. Technique utilisée selon la revendication 9, où le contrôle interne de la réaction est l'albumine
 - 9.4. Technique utilisée selon la revendication 9, où les amorces de l'albumine peuvent être utilisées à des concentrations allant de 300nM à 5μM, et les sondes (pour les gènes cibles comme pour l'albumine) à des concentrations allant de 100nM à 400nM
 - 9.5. Technique utilisée selon la revendication 9, où le mix de la réaction de QPCR provient du kit « LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes » de *Roche*
- 10. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification ASB-QPCR du gène *tp53* (SEQ ID No. 4-6)
 - 11. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification ASB-QPCR du gène *idh1* (SEQ ID No. 7-9)
 - 12. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification ASB-QPCR du gène *h3f3a* (SEQ ID No. 10-12)
 - 13. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification ASB-QPCR du gène *atrx* (SEQ ID No. 13-15)
 - 14. **Set d'amorces/sonde** pour l'amplification QPCR du gène de l'albumine (SEQ ID No. 16-18)
 - 15. Technique de mesure de la longueur des télomères par QPCR pour **utilisation** en tant que test d'identification des cellules ALT-positives
 - 16. **Kit** contenant les consommables et les protocoles pour la réalisation de la combinaison décrite à la revendication 1.

Commentaires

L'invention présentée dans cette demande est brevetable car :

- Il s'agit bien d'une invention (autrement dit, une solution technique à un problème technique, qui est l'absence de méthodes fiables et sensibles pour la détection *in vitro* des cellules tumorales) ;
- Elle n'est pas exclue de la brevetabilité, car notre kit n'est pas destiné à une utilisation dans le cadre du diagnostic du cancer (d'autres techniques, spécifiques à chaque type de cancer, existent déjà à cet effet). A la place, il est destiné à l'industrie des biotechnologies, puisque son application est beaucoup plus large ;
- Elle répond aux critères de brevetabilité, à savoir la nouveauté, l'activité inventive et l'application industrielle.

Pour pouvoir exploiter le kit, nous devons contracter des licences avec les deux acteurs possédant les brevets pour le test « *Mesure de l'activité de la télomérase* » (Roche Diagnostics GmbH) et pour le test « *Mesure de la longueur des télomères* » (University of Utah Research Foundation).

Une fois que nous aurons acquis le droit d'exploiter ces technologies, les perspectives de commercialisation de ce kit pourront être concrétisées. Nous prévoyons en outre de le proposer au secteur de la thérapie cellulaire. Les entreprises actives sur ce marché en auraient en effet une grande utilité dans le cadre de l'évaluation de la sécurité de leur produit. Avant l'injection chez le patient, elles ont l'obligation de vérifier que leur produit final ne contient pas de cellules tumorales.

En relation avec le ciblage du marché de la thérapie cellulaire, il est intéressant d'obtenir une protection en Europe car c'est dans cette zone géographique que les entreprises de thérapie cellulaire sont les plus présentes et influentes. Pour déposer le brevet, nous avons donc opté pour la voie régionale : une procédure de dépôt sera réalisée dans la région « Europe », ce qui donnera lieu à plusieurs procédures nationales de délivrance.

Bien que notre invention soit brevetable, la protection par un brevet ne présente pas, sur le long terme en tout cas, un grand intérêt ni une valeur importante. En effet, ce brevet peut être contourné par l'utilisation d'une autre méthode d'analyse des cellules télomérase-positives ou ALT-positives ou encore en modifiant certaines caractéristiques de chaque test. Ce risque est non-négligeable étant donné que ce kit constitue pour l'instant notre *core business*, l'unique produit à la tête de notre entreprise.

Cependant, obtenir un brevet pourrait nous donner une longueur d'avance sur nos concurrents. En effet, leur interdire d'utiliser notre kit pousserait nos concurrents à trouver des alternatives. Ils engageront ainsi un nouveau travail de développement et de validation de méthodes analytiques. En faisant barrage, nous gagnerions donc du temps pour investir en R&D et élargir nos champs « produit » et « client ». Après une ou deux années, cette stratégie ne sera plus efficace, puisque les concurrents auront alors terminé le développement d'alternatives à notre kit. Le brevet n'aura alors plus aucune valeur. Pour cette raison, ainsi que pour éviter de payer pour une protection que nous jugeons inutile, nous pouvons envisager de faire tomber le brevet à ce moment (en arrêtant de payer les redevances).

Mentionnons que divulguer toute l'information de notre invention dans une demande de brevet pourrait accélérer le développement d'alternatives par nos concurrents. Pour éviter ceci, nous pouvons également opter pour une protection par le secret, plus fragile mais peut-être plus efficace face à la concurrence.

Annexes

I. Description des quatre tests contenus dans notre kit/invention de combinaison

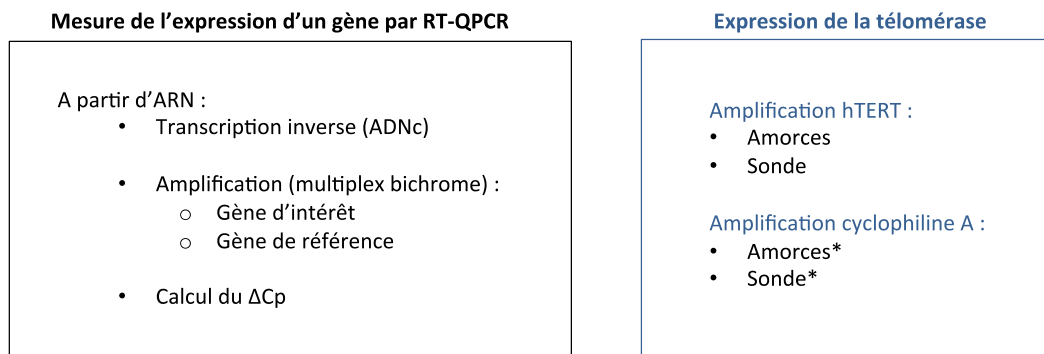


Figure 1. Description du test « *Mesure de l'expression de la télomérase* ». Les éléments marqués par un astérisque (*) sont ceux qui sont propres à notre expertise.

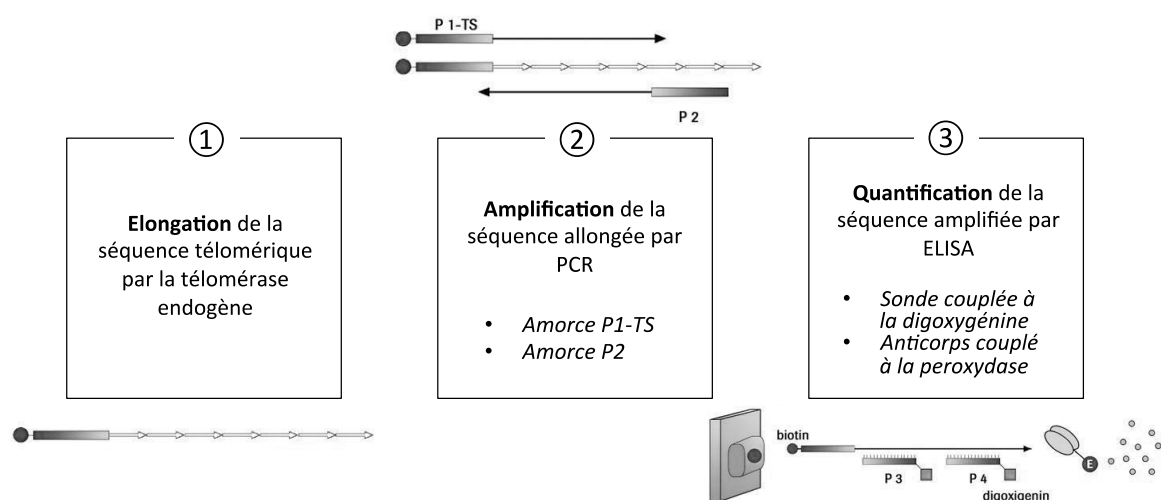


Figure 2. Description du test « *Mesure de l'activité de la télomérase* ».

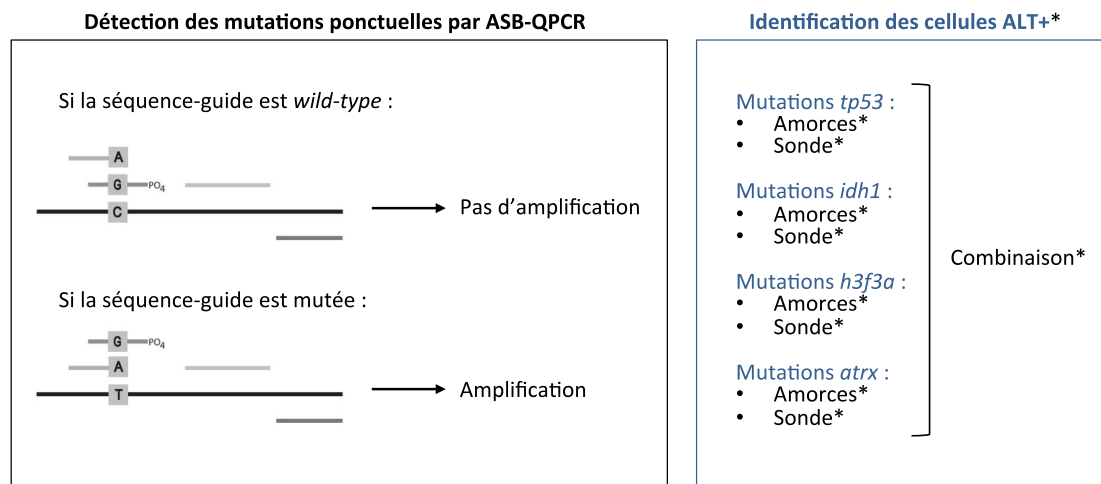


Figure 3. Description du test « *Détection des mutations spécifiques à ALT* ». Les éléments marqués par un astérisque (*) sont ceux qui sont propres à notre expertise.

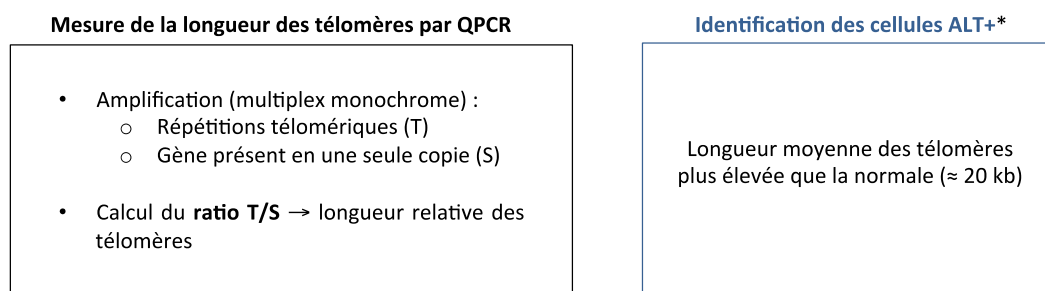


Figure 4. Description du test « *Mesure de la longueur des télomères* ». Les éléments marqués par un astérisque (*) sont ceux qui sont propres à notre expertise.

Annexes financières

Les autres valeurs citées précédemment dans le document ne se retrouvant pas dans la présente annexe ont été obtenues soit lors d’entretiens téléphoniques (*Roche, Eppendorf*), soit lors de rencontres avec des professionnels du secteur (*Celyad, B&C Group*).

E.1 Détail du coût des tests

E.1.1 Test 1 : mesure de l'expression de la télomérase

PRODUCT	PROVIDER, REFERENCE	UNIT QUANTITY	QUANTITY PER BATCH	UNIT PRICE	PRICE PER BATCH
RNeasy Mini Kit	Qiagen, #74104	50	1	245€	4.9€
Ethanol 96%	Merck Millipore	1L	245µL	49.30€	0.012€
Myc-DDK-tagged human telomerase reverse transcriptase (TERT), transcript variant 1	Origene, #RC217436	10µg	3ng	1630€	0.00049€
Untagged human peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Origene, #SC111937	10µg	3ng	185€	0.000055€
Cyclophilin primers	Integrated DNA Technologies, #hCyclo-A119 #hCyclo-A196	2400	12	5.75€	0.029€
		3000	12	7.50€	0.03€
Cyclophilin probe	Integrated DNA Technologies, #hCyclo-S142	5000	12	414.15€	0.99€
hTERT primers+probe	Applied Biosystems, #Hs00162669-m1	250	12	117€	5.6€
LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes	Roche, #04991885001	500	12	528€	12.67€
PCR plate + sealing foil	Roche, #04729692001	50	1	315€	6.3€
0.5mL Eppendorf tubes	VWR	100	2	10.44€	0.21€
Tips PCR	VWR	10	1	100.8€	10.08€
Sterile non woven swabs or equivalent	VWR, #112-2754	100	4	10.80€	0.432€
RNase AWAY®	Sigma-Aldrich	N/A	N/A	75€	1€
Total					42.25€

E.1.2 Test 2 : mesure de la longueur des télomères

PRODUCT	PROVIDER, REFERENCE	UNIT QUANTITY	QUANTITY PER BATCH	UNIT PRICE	PRICE PER BATCH
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, #69504	50	1	187€	3.74€
Ethanol 96%	Merck Millipore	1L	245µL	49.30€	0.012€
Human genomic DNA	Promega, #G3041	450µL	1.2µL	126€	0.336€
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, #04707516001	500	9	380€	6.84€
Telomere primers	Integrated DNA Technologies, telg telc	31000	9	20€	0.006€
		5400	9	20€	0.03€
Albumine primers	Integrated DNA Technologies, albd albu	2400	9	20€	0.075€
		2900	9	20€	0.06€
PCR plate + sealing foil	Roche, #04729692001	50	1	315€	6.3€
0.5mL Eppendorf tubes	VWR	100	2	10.44€	0.21€
Tips PCR	VWR	10	1	100.8€	10.8€
Sterile non woven swabs or equivalent	VWR, #112-2754	100	4	10.80€	0.432€
Total					28.84€

E.1.3 Test 3 : signature mutationnelle ALT

PRODUCT	PROVIDER, REFERENCE	UNIT QUANTITY	QUANTITY PER BATCH	UNIT PRICE	PRICE PER BATCH
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, #69504	50	1	187€	3.74€
LightCycler® RNA Master Hydrolysis Probes	Roche, #04991885001	500	72	709.40€	102.15€
Control plasmids :	Origene				
• TP53 WT	• #RC200003	• 10µg	• 3ng	• 560€	• 0.17€
• TP53 R273H	• #RC400072	• 10µg	• 3ng	• 500€	• 0.15€
• TP53 R273C	• #RC400073	• 10µg	• 3ng	• 500€	• 0.15€
• TP53 R175H	• #RC400040	• 10µg	• 3ng	• 580€	• 0.17€
• TP53 R248W	• #RC400063	• 10µg	• 3ng	• 580€	• 0.17€
• TP53 R248Q	• #RC400064	• 10µg	• 3ng	• 580€	• 0.17€
• IDH1 WT	• #RC210582	• 10µg	• 3ng	• 560€	• 0.17€
• IDH 1 R132H	• #RC400096	• 10µg	• 3ng	• 680€	• 0.2€
• H3F3A WT	• #RC209908	• 10µg	• 3ng	• 390€	• 0.12€
• H3F3A K28M	• N/A	• 10µg	• 3ng	• 2000€*	• 0.6€
• H3F3A G34R	• N/A	• 10µg	• 3ng	• 2000€*	• 0.6€
• H3F3A G34V	• N/A	• 10µg	• 3ng	• 2000€*	• 0.6€
• ATRX WT	• #RC215176	• 10µg	• 3ng	• 1220€	• 0.37€
Primers/probe :					
Primer forward WT (x4)	IDT	• 3000 (x4)	• 9 (x4)	• 100€	• 1.2€
Primer forward Mut (x9)		• 3000 (x9)	• 9 (x4)	(x4)	• 0.54€
Primer reverse (x4)		• 3000 (x4)	• 9 (x4)	• 20€ (x9)	• 0.24€
Probe (x4)		• 3000 (x4)	• 9 (x4)	• 20€ (x4)	• 3.6€
				• 300€ (x4)	
PCR plate+foil	Roche, #04729692001	50	1	315€	6.3€
0.5mL Eppendorf tubes	VWR	100	7	10.44€	0.73€
Tips	VWR	10	3	100.8€	30.24€
Total					152.38€

E.2 Bilan prévisionnel à trois ans

	2016	2017	2018	2019
Actifs immobilisés	89,524	70,677	94,229	72,782
Frais de constitution	2,000	2,000	2,000	2,000
Immobilisations incorporelles	2,399	2,399	12,399	22,399
Immobilisations corporelles	89,836	89,836	132,836	132,836
Amortissements cumulés	-4,712	-23,559	-53,006	-84,453
Actifs circulants	55,234	14,023	200,198	835,099
Stocks	11,000	11,000	11,000	15,840
Créances commerciales	-	49,005	181,500	319,440
Compte courant TVA	24,745	-	-	-
Trésorerie	19,488	-45,982	7,698	499,819
Total de l'actif	144,757	84,699	294,427	907,881
Capitaux propres	21,398	-70,107	57,597	579,180
Capital	45,000	45,000	145,000	145,000
Réserves et résultat reporté	-23,602	-115,107	-87,403	434,180
Dettes bancaires et emprunts	118,277	117,757	96,923	85,763
Emprunt 1 - ING	118,277	107,757	96,923	85,763
Crédit de caisse	-	10,000	-	-
Autres dettes	5,082	37,049	139,908	242,939
Dettes commerciales	5,082	27,316	105,573	168,517
Compte courant TVA	-	9,734	34,335	74,422
Autres dettes	-	-	-	-
Total du passif	144,757	84,699	294,427	907,881

E.3 Résultats prévisionnels à trois ans

	2016	2017	2018	2019
Chiffre d'affaires	-	202,500	1,032,500	2,376,000
<i>Services</i>	-	202,500	148,500	-
<i>Kit</i>	-	-	884,000	2,376,000
Coûts des ventes	-	91,125	464,625	1,069,200
<i>Achats</i>	-	60,750	309,750	712,800
<i>Autres coûts</i>	-	30,375	154,875	356,400
Marge brute d'exploitation	-	111,375	567,875	1,306,800
en % du chiffre d'affaires		55.0%	55.0%	55.0%
Charges d'exploitation	18,300	180,322	507,080	533,627
1. Frais généraux	12,600	51,300	237,000	237,000
610 - Loyers et charges locatives	7,500	30,000	30,000	30,000
6120 - Fournitures - Eau, gaz, électricité, vapeur	300	1,200	1,200	1,200
6121 - Fournitures - Téléphones, GSM, Internet	600	2,400	2,400	2,400
6124 - Fournitures - Autres	150	600	600	600
6131 - Assurances hors RH (incendie, vol, autos, crédit)	900	3,600	3,600	3,600
61321 - Honoraires d'experts - Comptables & fiscalistes	300	1,200	1,200	1,200
61321 - Honoraires d'experts - Secrétariats sociaux	900	3,600	3,600	3,600
61330 - Frais Transport - Personnel	600	2,400	6,000	6,000
615 - Laboratoire production (GMP)	-	-	180,000	180,000
6402 - Taxes et impôts - Région, Provinces, Communes	300	1,200	1,200	1,200
66 - Imprévus	600	2,400	2,400	2,400
2. Rémunérations	5,700	129,022	270,080	296,627
Personnel employé	-	60,622	124,880	128,627
Administrateurs et gérants	5,700	68,400	145,200	168,000
EBITDA	-18,300	-68,947	60,795	773,173
Amortissements	4,712	18,847	29,447	31,447
Résultat d'exploitation	-23,012	-87,794	31,347	741,726
Charges fin. sur emprunts long terme	590	3,359	3,043	2,718
Charges fin. sur crédit de caisse	-	353	600	-
Résultat avant impôts	-23,602	-91,506	27,704	739,008
Impôts sur le résultat	-	-	-	217,425
Résultat après impôts	-23,602	-91,506	27,704	521,583

E.4 Flux de trésorerie

	2016	2017	2018	2019
1. Cash-flow opérationnel				
Résultat hors amortissements	-18,890	-72,659	57,152	553,030
Variation du besoin en fonds de roul.	-30,663	7,708	-29,637	-39,749
Variation stock	-11,000	-	-	-4,840
Variation des créances commerciales	-	-49,005	-132,495	-137,940
Variation du compte TVA	-24,745	24,745	-	-
Variation des autres créances	-	-	-	-
Variation des dettes commerciales	5,082	22,234	78,257	62,944
Variation du compte TVA	-	9,734	24,602	40,087
Variation des autres dettes	-	-	-	-
Cash-flow issu de l'activité	-49,553	-64,951	27,515	513,281
2. Cash-flow financier				
Financements	165,000	-	100,000	-
Capital	45,000	-	100,000	-
Emprunt 1 - ING	120,000	-	-	-
Remboursement des emprunts	-1,723	-10,519	-10,835	-11,160
Emprunt 1 - ING	-1,723	-10,519	-10,835	-11,160
Cash-flow financier	163,277	-10,519	89,165	-11,160
3. Investissements				
Investissements	-94,235	-	-53,000	-10,000
Variation de trésorerie	19,488	-75,470	63,680	492,121
Trésorerie	19,488	-55,982	7,698	499,819

E.5 Devis

Louvain Coworking Space

Tableau des prix 2016



Louvain Coworking Space

STARTER : 80 € / mois HTVA pour la formule 1 jour/semaine

FLEX : 165 € / mois HTVA pour la formule mi-temps

NO LIMIT : Accès illimité avec full service pour 250 € / mois

Conditions particulières pour les entreprises

<http://louvaincoworking.com/tarifs/nouveaux-abonnements/>

<http://louvaincoworking.com/tarifs/equipes-entreprises/>



CEI Louvain
Where Business & Innovation Converge

CEI Louvain - Bureaux privés

605 € / mois (HTVA) pour la configuration de base 15 m2 totalement équipée, full service

Congélateurs

VOTRE DEVISE  INSTRUMENTS SCIENTIFIQUES
POUR LE LABORATOIRE ET L'INDUSTRIE

Votre recherche...

OK

[Accueil](#) > [Technique de laboratoire](#) > [Congélateur vertical](#)

Congélateur vertical

BEST SELLERS

Antidéflagrant

[Froster Labex-330](#)

6 037,71 €

5 433,94 €

Articles 1 à 30 sur un total de 43

Page : 1 2 >

Afficher 30 ▼ par page

Afficher en: [Liste](#) [Grille](#)Trier par [Prix croissant](#) ▼

BLACKLINE : LE MEILLEUR PRIX

LOCATION

○○○○○

AGROALIMENTAIRE

ANALYSE DE L'EAU

BALANCES / PESAGE

BIOTECHNOLOGIES

CONTRÔLE QUALITÉ

ETUVE / ENCEINTE CLIMATIQUE

FROID PROFESSIONNEL

MATÉRIEL ATEX

MÉDICAL

MESURE ÉLECTRIQUE

MESURE ENVIRONNEMENTALE

MICROSCOPIE / OPTIQUE

MOBILIER DE LABORATOIRE

NETTOYAGE / STÉRILISATION

SÉCURITÉ / HYGIÈNE

TECHNIQUE DE LABORATOIRE

VERRERIE / CONSOMMABLE

Opérations Spéciales >

LES PROMOTIONS >

LES NOUVEAUTÉS >

Les études de cas >

POUR TOUTE COMMANDE > 500€ HT*

[KIR-10100](#)[Congélateur à médicaments KIRSCH Froster MED-70](#)

1 998,86 € HT

Congélateur à médicaments Froster Med-70 - KIRSCH
Capacité: **70 litres** - Gamme de température: **-15...-22°C**
Dimensions intérieures (L x H x P): **350 x 550 x 410 mm**
Groupe de froid renforcé pour pays chaud (Option)
[En savoir plus](#)

>> [Ajouter à ma liste](#)

COMMANDER OU CRÉER UN DEVIS

[KIR-10306](#)[Congélateur de laboratoire antidéflagrant KIRSCH Froster LABEX-70](#)

2 270,86 € HT

Congélateur antidéflagrant Froster Labex-70 - KIRSCH
Capacité: **70 litres** - Gamme de température: **-15...-22°C**
Dimensions intérieures (L x H x P): **350 x 550 x 410 mm**
Cuve sécurisée agréée ATEX EX II 3G T6
[En savoir plus](#)

>> [Ajouter à ma liste](#)

COMMANDER OU CRÉER UN DEVIS

[FRY-B3020](#)[Congélateur de laboratoire sur paillasse -20°C - B 30-20 - Fryka](#)

2 400,00 € HT

Congélateur vertical sur paillasse B 30-20 - Fryka
Gamme de temp. : **-20...+10°C** - Volume : **30 litres**
Habillage inox - **Porte vitrée**
[En savoir plus](#)

>> [Ajouter à ma liste](#)

COMMANDER OU CRÉER UN DEVIS

Centrifugeuse

Date : 29 avril 2016
 Offre Thermo Scientific Centrifuge
 Notre réf.: MT/mae16.250/OFF -1267582
 Personne à contacter: Marc Tartarin
 Customer Service:sales.labequip.bnl@thermofisher.com
 Tel.: +32 (0) 53 73 42 41
 Fax: +32 (0) 53 73 42 42

Thermo Fisher Scientific B.V.B.A.
 Ninovesteenweg 198
 B-9320 Erembodegem
 Belgium
 BTW: 0449.564.217
 DEUTBEBE
 BE88826000516541

Art. number	Article description	Quote price EUR	QTY	Total EUR
75004081	Thermo Scientific mySPIN 12	759,00	1	759,00
75004061	Thermo Scientific mySPIN 6	284,00	1	284,00

Adresse de commande:

Thermo Fisher Scientific B.V.B.A.
 Ninovesteenweg 198
 B-9320 Erembodegem
 Belgium
 BTW: 0449.564.217
 Tel : 053/734241
 Fax : 053/734242
 Email : sales.labequip.bnl@thermofisher.com

Conditions:

- les prix sont valables jusque fin 2016.
- les prix sont hors tva et récupel.
- livraison : franco rez-de-chaussée votre adresse.
- paiement : 30 jours date facture.
- les conditions générales de Thermo Fisher Scientific sont d'application
- pour des commandes inférieures à € 250,00 nous chargeons des frais administratifs de € 22,00.
- garantie : 2 ans

Plaque chauffante



Tartarin, Marc

2016-05-11 12:07 PM

FW: Thermo Scientific Offer MT/mae16.250/Off

To: Robin Pétré Cc: Aerden, Mimi

Bonjour,

Veuillez trouver ci-après le prix :

2000-1CEQ : € 679,-

Prix hors T.V.A. 21% et taxe Recupel

Bien à vous,

Marc Tartarin

Area Sales Manager

Laboratory Products

Thermo Fisher Scientific

Ninovesteenweg 198 | Erembodegem-Aalst, 9320, Belgium

Phone +32 (0) 53 73 42 41 | Mobile: +32 (0) 496 275 274 | Fax: +32 (0) 53 73 42 42

marc.tartarin@thermofisher.com | www.thermo.com

Nanodrop



Aurélien Baudot
2016-05-02 12:07 PM



Prix Nanodrop etc

To: Robin.petre@student.uclouvain.be



editdata.mso
84 bytes

Bonjour Robin,

Par rapport au Nanodrop, le prix catalogue est de 12.444 €

Pour tout ce qui est matériel de laboratoire, consommables etc, si vous avez besoins de prix/infos, n'hésitez pas à me le faire savoir.
PCR, centrifugeuse, ...

Bonne journée,
Aurélien

Aurélien Baudot

Area Manager BeLux



Isogen Life Science bv

Veldzigt 2a, 3454 PW De Meern, the Netherlands

Cell: +32 471 841 539
Belgium: 0 800 54 048

Int'l: +31 30 688 0771
Fax: +31 30 688 8009

①: www.isogen-lifescience.com

TROISIÈME PARTIE

Bibliographie

Références générales

- Abedalthagafi, M. et al., 2013. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(11), pp.1425–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765250>.
- AIPPI, n.d. Résolution sur la question 53A : Le know-how – Définition – Régime juridique, *Annuaire AIPPI*, 1974/I, p. 47-48. Available at: aippi.org [Accessed May 6, 2016].
- Ampliqon, MgCl₂. Available at: [http://www.ampliqon.com/media/25844/25 mm mgcl2.pdf](http://www.ampliqon.com/media/25844/25_mm_mgcl2.pdf) [Accessed November 26, 2015].
- Ankrum, J. a, Ong, J.F. & Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, 32(3), pp.252–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561556>.
- Annibaldi, A. & Widmann, C., 2010. Glucose metabolism in cancer cells. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(4), pp.466–470.
- Armbruster, D.A. & Pry, T., 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 29 Suppl 1, pp.S49–S52.
- ATCC, 2014a. A549 (ATCC® CCL-185™). Available at: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=be [Accessed August 27, 2015].
- ATCC, 2014b. HT-1080 [HT1080] (ATCC® CCL-121™). Available at: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-121.aspx?geo_country=be [Accessed August 27, 2015].
- Atdbio, FAM (fluorescein), HEX, JOE, ROX, TAMRA, TET, Texas Red® and others. Available at: <http://www.atdbio.com/content/33/FAM-fluorescein-HEX-JOE-ROX-TAMRA-TET-Texas-Red-and-others> [Accessed December 1, 2015a].
- Atdbio, Synthesis and applications of chemically modified oligonucleotides. Available at: <http://www.atdbio.com/content/19/Synthesis-and-applications-of-chemically-modified-oligonucleotides#The-3-phosphate-group-as-a-PCR-blocker> [Accessed November 16, 2015b].

-
- Aubert, G., Hills, M. & Lansdorp, P.M., 2012. Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1-2), pp.59–67. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003>.
- Barkholt, L. et al., 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies - Bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*, 15(7), pp.753–759.
- Bartunek, J. et al., 2013. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: The C-CURE (cardiopoietic stem cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(23), pp.2329–2338.
- Bartunek, J. et al., 2008. Mesenchymal stem cells and cardiac repair: principles and practice. *Journal of cardiovascular translational research*, 1(2), pp.115–119.
- Beckermann, J., 2014. Coronary heart disease. Available at: <http://www.webmd.com/heart-disease/guide/heart-disease-coronary-artery-disease?page=3> [Accessed August 4, 2015].
- Behfar, A. et al., 2007. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *The Journal of experimental medicine*, 204(2), pp.405–420.
- Behfar, A. et al., 2008. Guided stem cell cardiopoiesis: Discovery and translation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(4), pp.523–529.
- Belga, 2016. *Etudes cliniques : 6 pour cent de lancement en plus en Belgique*, Communiqué de presse, 9 mai 2016.
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R. a., 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(5 SPEC. ISS.), pp.961–976.
- Biology/Medicine Animations HD, 2014. *DNA Replication Process (3D Animation)*, Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=27TxKoFU2Nw>.
- Bioscience, C., 2015. Tumour Sensitivity Assays. Available at: <http://www.bioscience.co.uk/cpl/134470/949> [Accessed August 27, 2015].
- BioSearch Technologies, Black Hole Quencher® Dyes. Available at:

-
- <https://www.biosearchtech.com/support/education/fluorophores-and-quenchers/black-hole-quencher-dyes> [Accessed December 9, 2015].
- Biosistemika, Real-time PCR technology basics. Available at: <http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/> [Accessed November 18, 2015].
- Biosource, 2009. alamarBlue Assay. , pp.1–27.
- Boomsma, R.A. & Geenen, D.L., 2012. Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis. *PLoS ONE*, 7(4), p.e35685.
- Bork, S. et al., 2010. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 9(1), pp.54–63.
- Borowicz, S. et al., 2014. The Soft Agar Colony Formation Assay. *Journal of Visualized Experience*, 92.
- Broeders, S. et al., 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology*, 37(2), pp.115–126. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>.
- Brownie, J. et al., 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, 25(16), pp.3235–3241.
- Buczkowicz, P. et al., 2014. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nature genetics*, 46(5), pp.451–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2936>.
- Calado, R.T. & Young, N.S., 2008. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*, 111(9), pp.4446–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2343587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Callicott, R.J. & Womack, J.E., 2006. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comparative Medicine*, 56(1), pp.17–22.
- Campisi, J., 1997. The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer Part A*, 33(5), pp.703–709.
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp.729–740.

-
- Cawthon, R.M., 2009. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), pp.1–7.
- Cawthon, R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), p.e47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129229>.
- Cell Biolabs, Soft Agar Assays for Anchorage Independent Cell Growth. Available at: <http://www.cellbiolabs.com/news/soft-agar-assays-anchorage-independent-cell-growth> [Accessed August 26, 2015].
- Cell Culture, 2011. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Available at: <http://himedialabs.com/TD/AT068.pdf> [Accessed August 27, 2015].
- Celyad, 2015. DOMAINES THERAPEUTIQUES - Maladies cardiovasculaires. Available at: <http://www.celyad.com/domaines-therapeutiques/cardiologie.htm?lng=fr> [Accessed August 4, 2015].
- Cesare, A.J. & Reddel, R.R., 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), pp.319–330. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2763>.
- Cesare, A.J. & Reddel, R.R., 2008. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mechanisms of ageing and development*, 129(1-2), pp.99–108. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215414>.
- Chen, Y.J. et al., 2006. Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Research*, 66(13), pp.6473–6476.
- Chin, L. et al., 2011. Making sense of cancer genomic data. *Genes and Development*, 25(6), pp.534–555.
- Chuaire-Noack, L., Sánchez-Corredor, M.C. & Ramírez-Clavijo, S.R., 2010. The Dual Role of Senescence in Tumorigenesis. *International Journal of Morphology*, 28(1), pp.37–50.
- Cohen-Haguenauer, O., 1999. Réglementation de la Thérapie génique, médecine/sciences n°5, vol. 15, pp.682–690.
- Cold Spring Harbor Laboratory (DNA Learning Center), Polymerase Chain Reaction. Available at: <https://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html> [Accessed November 9, 2015].
- Cong, Y.-S., Wright, W.E. & Shay, J.W., 2002. Human telomerase and its regulation.

-
- Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(3), pp.407–25, table of contents. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208997>.
- Criscuolo, F. et al., 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *Journal of Avian Biology*, 40(3), pp.342–347.
- Delestrait, T., 2015. *La régulation financière par l'INAMI*, Services soins de santé.
- Deng, Y. & Chang, S., 2007. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 87(11), pp.1071–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767195>.
- Deval, H., 2015. *Consumer Behavior*, notes de cours, Dalhousie University, Chapitres 1-8.
- Diotti, R. & Loayza, D., 2011. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2(2), pp.119–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Drug.com, 2015. Hartmann's solution. Available at: <http://www.drugs.com/uk/hartmanns-solution-leaflet.html> [Accessed August 27, 2015].
- England Biolabs, DNA Polymerase Thermostability. Available at: <https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/dna-polymerase-thermostability> [Accessed November 26, 2015].
- Episkopou, H. et al., 2014. Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. *Nucleic acids research*, 42(7), pp.4391–405. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/42/7/4391.long>.
- European Cytogeneticists Association, 2012. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. *E. c. association*, 29, p.19.
- European Medicines Agency, 2011. *Guideline on bioanalytical method validation*, Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
- EuroStemCell, 2015. iPS cells and reprogramming: turn any cell of the body into a stem cell. Available at: <http://www.eurostemcell.org/factsheet/ips-cells-and-reprogramming-turn-any-cell-body-stem-cell> [Accessed December 2, 2015].

-
- EuroStemCell, 2015. Regulation of stem cell research in Europe. Available at: <http://www.eurostemcell.org/stem-cell-regulations> [Accessed May 2, 2016].
- Garcia, S. et al., 2010. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 316(9), pp.1648–1650.
- Garg, B., Bisht, T. & Ling, Y.-C., 2015. Graphene-Based Nanomaterials as Efficient Peroxidase Mimetic Catalysts for Biosensing Applications: An Overview. *Molecules*, 20(8), pp.14155–14190.
- Gil, M.E. & Coetzer, T.L., 2004. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Molecular biotechnology*, 27(2), pp.169–172.
- Gotteland, D., 2000. *Comment surpasser l'avantage du premier entrant*, Décisions marketing, N°21, pp. 7-14.
- Guadamillas, M.C., Cerezo, a. & del Pozo, M. a., 2011. Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science*, 124(19), pp.3189–3197.
- Gutierrez-Rodrigues, F. et al., 2014. Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PloS one*, 9(11), p.e113747. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4237503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hahn, W.C. et al., 1999. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature medicine*, 5(10), pp.1164–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502820>.
- Hamid, R. et al., 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*, 18(5), pp.703–710.
- Hanahan, D., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674\(00\)81683-9](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674(00)81683-9) \n<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195FC1-5/2/aef1d48431eadea4567b697b1fee0514>.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Harley, C.B. et al., 1994. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor Symposia*

- Harris, P. & Ralph, P., 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of leukocyte biology*, 37, pp.407–422.
- HarrisWilliams & Co, 2014. Contract research organization industry overview. Available at : http://www.harriswilliams.com/sites/default/files/industry_reports/2014.4.17_contract_research_organizations.pdf [Accessed May 25, 2016].
- Harvard Business Review France, 2014. En france, les cinq forces de Porter sont six, Chronique, en ligne. Available at : <http://www.hbrfrance.fr/chroniques-experts/2014/07/2616-les-cinq-forces-de-la-concurrence-et-les-trois-mousquetaires/>
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, pp.585–621.
- Heaphy, C.M. et al., 2011. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6041), p.425.
- Heaphy, C.M. et al., 2011. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *American Journal of Pathology*, 179(4), pp.1608–1615.
- Heidinger, B.J. et al., 2012. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113306109>.
- Henson, J.D. et al., 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, 21(4), pp.598–610. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11850785>.
- Henson, J.D. et al., 2009. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nature biotechnology*, 27(12), pp.1181–1185. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1587>.
- Henson, J.D. & Reddel, R.R., 2010. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Letters*, 584(17), pp.3800–3811. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.009>.
- Hiyama, E. et al., 2001. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 3(1), pp.17–26. Available at:

-
- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1505023&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hiyama, E. & Hiyama, K., 2007. Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, 96(7), pp.1020–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17353922>.
- Holt, E. et al., 1998. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(8), pp.1581–1593.
- Horbinski, C., 2013. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta neuropathologica*, 125(5), pp.621–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3633675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Houghton, J. et al., 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5701), pp.1568–1571.
- Houssin, D., 2015. THERAPEUTIQUE - Thérapies substitutives et régénératrices. *Encyclopaedia Universalis*. Available at: <http://www.universalis.fr/encyclopedia/therapeutique-therapies-substitutives-et-regeneratives/2-les-therapies-cellulaires/#> [Accessed August 5, 2015].
- Huffman, K.E. et al., 2000. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), pp.19719–19722.
- ICH Guidelines, 1995. *Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures*, Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073381.pdf>.
- ICH Guidelines, 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*,
- Institut scientifique de santé publique, n.d. Programme de monitoring bpl belge. Available at : <https://www.wiv-isp.be/Programs/GLP-monitoring/Pages/FR-Direction.aspx> [Accessed May 29, 2016].
- Institut scientifique de santé publique, n.d. Qualité des laboratoires médicaux, service. Available at : <https://www.wiv-isp.be/Programs/Expertise-Service-Client-Relations/Pages/FR-Evaluationdequalitedeslaboratoiresmedicaux.aspx?pflg=1036> [Accessed May 29, 2016].

IRIC, Information on qPCR results. Available at:
https://genomique.irc.ca/resources/files/How_to_deal_with_qPCR_results.pdf
[Accessed December 1, 2015].

Itinera Institute, 2012. La poule aux œufs d'or des médicaments en Belgique : réformer ou préserver ?, Des idées, des actions, 2012/6. Available at :
http://www.itinerainstitute.org/sites/default/files/articles/pdf/20120510_analyse_generieken_pvh_fr_1.pdf

Jiao, Y. et al., 2012. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*, 3(7), pp.709–722. Available at:
[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=588&path\[\]=912](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=588&path[]=912).

Jodczyk, S., 2011. *Establishment and validation of a telomere length assay*. University of Otago.

Jodczyk, S. et al., 2014. No association between mean telomere length and life stress observed in a 30 year birth cohort. *PloS one*, 9(5), p.e97102. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816913> \n <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4016252/pdf/pone.0097102.pdf>.

Jung, S. et al., 2012. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells International*.

Kannan, K. et al., 2012. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget*, 3(10), pp.1194–203. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3717947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Kimura, M. et al., 2010. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature protocols*, 5(9), pp.1596–1607.

Kondo, Y. et al., 2014. Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Science*, 105(4), pp.363–369.

Kornberg, A. & Baker, T., 2005. *DNA Replication* University Science Books, ed.,

Kreader, C.A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), pp.1102–1106. Available at: <http://aem.asm.org/content/62/3/1102.abstract>.

Kuilman, T. et al., 2010. The essence of senescence. *Genes and Development*, 24(22), pp.2463–

- Langevin, S.A. et al., 2013. Peregrine: A rapid and unbiased method to produce strand-specific RNA-Seq libraries from small quantities of starting material. *RNA biology*, 10(4), pp.502–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3710357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lee, J.-C. et al., 2015. Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2015.67>.
- Lendrevie J., Levy J., 2014. *Mercator – Tout le marketing à l'ère numérique*, Paris, Dunod, 2014, 1040 p.
- Lexology 2008. The ATMP regulation – a Belgian perspective. Available at: <http://www.lexology.com/library/detail.aspx?g=dfeadd90-000b-403c-a416-f835efec349b> [Accessed May 29, 2016].
- Lieberman, M., Montgomery, D. 1988. First-mover advantages, *Strategic Management Journal*, Volume 9, pp. 41-58.
- Life Technologies, Real-time PCR handbook. Available at: <http://www.genequantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> [Accessed November 20, 2015].
- Ligue Cardiologie Belge, Insuffisance cardiaque. Available at: <http://liguecardioliga.be/maladies/linsuffisance-cardiaque/> [Accessed August 4, 2015].
- Liu, X.Y. et al., 2012. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathologica*, 124(5), pp.615–625.
- Lovejoy, C.A. et al., 2012. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of Telomeres pathway. *PLoS Genetics*, 8(7).
- Machado, C.D.V., Telles, P.D.D.S. & Nascimento, I.L.O., 2013. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 35(1), pp.62–7.

-
- Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3621638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Malik, N., 2012. Allogeneic Versus Autologous Stem Cell Therapy. *BioPharm International*, 25.
- Mangerel, J.O., 2015. *Clinical and biological studies of the Alternative Lengthening of Telomeres in paediatric brain tumours*. University of Toronto.
- Maubaret, C.G. et al., 2010. Telomeres are shorter in myocardial infarction patients compared to healthy subjects: correlation with environmental risk factors. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(8), pp.785–94. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2900586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Maze, I., Noh, K.-M. & Allis, C.D., 2012. Histone Regulation in the CNS: Basic Principles of Epigenetic Plasticity. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp.3–22. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.124>.
- MedLinePlus (U.S. National Library of Medicine), 2013. Heart Failure. Available at:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000158.htm> [Accessed August 4, 2015].
- Mekeel, K.L. et al., 1997. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene*, 14(15), pp.1847–1857.
- Memorial University of Newfoundland, The Cell Cycle: DNA Replication and Mitosis. Department of Biology. Available at:
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/CB19.html>
 [Accessed October 1, 2015].
- Meyerson, M., 2000. Role of Telomerase in Normal and Cancer Cells. *J. Clin. Oncol.*, 18(13), pp.2626–2634. Available at: <http://jco.ascopubs.org/content/18/13/2626.abstract>.
- Mohseny, A.B. et al., 2009. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *The Journal of pathology*, 219(3), pp.294–305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718709>.
- Montpetit, A.J. et al., 2014. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nursing Research*, 63(4), pp.289–299. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24977726>.

-
- Mori, S. et al., 2009. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*, 28(31), pp.2796–2805. Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=19483725&lang=fr&site=ehost-live> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3008357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mørk, H.K. et al., 2009. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(4), pp.H1069–H1079.
- Morlan, J., Baker, J. & Sinicropi, D., 2009. Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PloS one*, 4(2), p.e4584. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2642996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- MPI Research, 2015. *Study: qPCR method validation for analysis of human cell distribution in farm pigs (GLP)*,
- Muñoz-Espín, D. & Serrano, M., 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(7), pp.482–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954210>.
- Murnane, J.P., 2012. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(415), pp.28–36.
- Murray, J.M. & Carr, A.M., 2008. Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp.177–182.
- Myerburg, R.J. & Castellanos, A., 2012. Cardiac Arrest and Sudden Cardiac Death. In Elsevier Saunders, ed. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. pp. 845–884.
- Nabetani, A. & Ishikawa, F., 2011. Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *Journal of Biochemistry*, 149(1), pp.5–14.
- Naesens, M., 2011. Replicative senescence in kidney aging, renal disease, and renal transplantation. *Discovery medicine*, 11(56), pp.65–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21276412>.

-
- Nandakumar, J. & Cech, T.R., 2013. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(2), pp.69–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3805138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- National Genetics and Genomics Education Center (NHS), Karyotyping. Available at: <http://www.geneticseducation.nhs.uk/laboratory-process-and-testing-techniques/karyotyping> [Accessed August 10, 2015].
- National Institutes of Health, What are induced pluripotent stem cells? Available at: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics10.aspx> [Accessed December 1, 2015].
- Neidle, S. & Parkinson, G.N., 2003. The structure of telomeric DNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(3), pp.275–283.
- Neumann, A.A. & Reddel, R.R., 2002. Telomere maintenance and cancer - look, no telomerase. *Nature Reviews Cancer*, 2(11), pp.879–884. Available at: <Go to ISI>://WOS:000180448200018\http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n11/pdf/nrc929.pdf.
- Nguyen, D. et al., 2013. Molecular and morphologic correlates of the alternative lengthening of telomeres phenotype in high-grade astrocytomas. *Brain Pathologies*, 23(3).
- Nollau, P. & Wagener, C., 1997. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin. Chem.*, 43(7), pp.1114–1128. Available at: <http://www.clinchem.org/content/43/7/1114.full>.
- O’Callaghan, N. et al., 2008. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques*, 44(6), pp.807–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476834>.
- Office Benelux de la propriété intellectuelle, n.d. i-DEPOT. Brochure de présentation. Available at : https://www.boip.int/wps/portal/site/ideas!/ut/p/a1/04_Sj9CPykssy0xPLMnMz0vMAfGjzOKdg5w8HZ0MHQ0Mfj3MDTx9Hb28_Xz8jC18DPWD04r0C7IdFQHP5sIP/ [Accessed April 16, 2016]
- Organisation Mondiale de la Santé, 1998. Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques - Recueil de directives et autres documents. Available at:

-
- <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h1814f/h1814f.pdf> [Accessed November 18, 2015].
- Palm, W. & de Lange, T., 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*, 42, pp.301–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680434>.
- Parida, M. et al., 2008. Rapid and Real-time Assays for Detection and Quantification of Chikungunya Virus. *Future Virology*, 3(2), pp.179–192.
- Parlement européen, 1990. Problèmes éthiques et juridiques de la manipulation génétique et de la fécondation humaine artificielle, Rapport par Rothley et Casini, Commission juridique et des droits des citoyens, pp. 1-79
- Pautke, C. et al., 2004. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 24(6), pp.3743–3748.
- Peretti, J.M., 2002. *Gestion des ressources humaines*, Paris, Vuibert 284 p.
- Petrovic, D., 2004. Cytopathological basis of heart failure--cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response. *Folia biologica*, 50(2), pp.58–62.
- Pfeiffer, V. & Lingner, J., 2013. Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), p.a010405.
- Pharma, 2015. L'industrie du médicament en Belgique, un vecteur de croissance, Chiffres-clés 2014.
- Podlevsky, J.D. & Chen, J.J.-L., 2012. It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutation research*, 730(1-2), pp.3–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093366>.
- Promega, Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. Available at: [http://www.promega.com/~media/files/resources/promega_notes/65/betaine and dmso- enhancing agents for pcr.pdf](http://www.promega.com/~media/files/resources/promega_notes/65/betaine_and_dmso-enhancing_agents_for_pcr.pdf) [Accessed November 26, 2015].
- PWC, 2015. The global innovation 1000 : Top 20 R&D spenders 2005-2014, Strategy&, en ligne. In: <http://www.strategyand.pwc.com/global/home/what-we-think/innovation1000/top-20-rd-spenders-2014>
- QIAGEN, QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Available at: <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en> [Accessed December 10, 2015a].

Qiagen, 2003. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. Available at: http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf [Accessed November 23, 2015].

QIAGEN, RNeasy Mini Kit Handbook. Available at: <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> [Accessed December 9, 2015b].

Rampersad, S.N., 2012. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), pp.12347–12360.

Reed, G.F., Lynn, F. & Meade, B.D., 2002. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(6), pp.1235–1239.

Research Gate, Determination of DNA Concentration and Purity by Ultraviolet Spectrophotometry. Available at: [file:///C:/Users/cbertrand/Downloads/09 UV Absorption.pdf](file:///C:/Users/cbertrand/Downloads/09%20UV%20Absorption.pdf) [Accessed December 9, 2015].

Roche Life Science, 2015. A propos de Roche, site officiel, en ligne. In : <http://www.roche.fr/leader-pharmaceutique.html>

Roche Life Science, TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA. Available at: <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?partNumber=3.5.4.1.1.1> [Accessed October 30, 2015].

Rodier, F. & Campisi, J., 2011. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), pp.547–556.

Røsland, G.V. et al., 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Research*, 69(13), pp.5331–5339.

Rubio, D. et al., 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, 65, pp.3035–3039.

Samassekou, O. et al., 2010. Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy*, 192(5), pp.284–291. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2010.07.005>.

Sandin, S. & Rhodes, D., 2014. Telomerase structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 25,

pp.104–110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.003>.

Sarkar, G., Kapelner, S. & Sommer, S., 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Research*, 18(24), p.7465.

Schwartz, K., BIOTHERAPIES - les thérapies géniques et cellulaires. INSERM. Available at: http://www.inserm.fr/content/download/60146/397746/version/1/file/Bioth%C3%A9rapies+_les+th%C3%A9rapies+g%C3%A9niques+et+cellulaires.pdf [Accessed August 5, 2015].

Schwartzentruber, J. et al., 2012. Corrigendum: Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 484(7392), pp.130–130.

Scientific, T., 2015. Technical Resources, 10010 - PBS, pH 7.4. Available at: <http://www.thermofisher.com/be/en/home/technical-resources/media-formulation.160.html> [Accessed August 27, 2015].

Service public fédéral belge, n.d. Indépendant à titre principal. Available at : http://www.belgium.be/fr/economie/entreprise/creation/independants/a_titre_principal [Accessed May 28, 2016].

Shaw, R.J., 2006. Glucose metabolism and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), pp.598–608.

Shay, J.W. et al., 2001. Telomerase and cancer. *Human molecular genetics*, 10(7), pp.677–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257099>.

Shen, Z., 2011. Genomic instability and cancer: An introduction. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(1), pp.1–3.

Silvestre, D.C. et al., 2011. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells*, 29(3), pp.440–451.

Slijepcevic, P., 2001. Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods in Cell Science*, 23(1), pp.17–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013177128297>.

SPF Economie, PME, Classes moyenne et Energie, 2015. Nom commercial et dénomination sociale, Entreprises et indépendants. Available at : http://economie.fgov.be/fr/entreprises/propriete_intellectuelle/Marques/Nom_commercial_denomination_sociale/#.Vz275VyWEYQ [Accessed May 10, 2016].

StemCell Technologies, CryoStor CS10. Available at:

-
- <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/CryoStorCS10.aspx> [Accessed October 30, 2015].
- Sturm, D. et al., 2012. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell*, 22, pp.425–437.
- Subhawong, A.P. et al., 2009. The alternative lengthening of telomeres phenotype in breast carcinoma is associated with HER-2 overexpression. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(11), pp.1423–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734843>.
- Sulli, G., Di Micco, R. & di Fagagna, F. d'Adda, 2012. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), pp.709–720.
- Suzuki, M. & Boothman, D. a, 2008. Stress-induced Premature Senescence (SIPS). *Journal of Radiation Research*, 49(2), pp.105–112. Available at: [files/1023/Suzuki and Boothman - 2008 - Stress-induced Premature Senescence \(SIPS\).pdf](#).
- Tarte, K. et al., 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115(8), pp.1549–53. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/115/8/1549.abstract>.
- Taylor, S. et al., 2011. *A practical approach to RT-qPCR - Publishing data that conform the MIQE guidelines*,
- ThermoFisher Scientific, 2015. Technical Resources, 12492 - Advanced MEM. Available at: <http://www.thermofisher.com/be/en/home/technical-resources/media-formulation.39.html> [Accessed August 27, 2015].
- Torsvik, Anja; Molven, Anders; McCormack, Emmet; Lonning Per Eystein; Primon, M. et al, 2010. Letter to the Editor: Spontaneous Malignant Transformation of Human Mesenchymal Stem Cells Reflects Cross-Contamination : Putting the Research Field on Track. *Cancer research*, 70(15), pp.6393–6396.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. & Von Zglinicki, T., 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), pp.927–945.
- U.S. Department of Health and Human Services et al., 2013. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, Available at:

-
- <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>.
- U.S. Department of Health and Human Services, 2014. What is coronary heart disease? Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad> [Accessed August 4, 2015].
- U.S. Food and Drug Administration, 2014. Guidance for Industry: Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy. Available at: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/cellularandgenetherapy/ucm072987.htm#i> [Accessed August 6, 2015].
- U.S. Food and Drug Administration, 2013. Guidance for Industry: Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Available at: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm376136.htm#IV> [Accessed March 20, 2016].
- Union des classes moyennes, 2015. Combien va me coûter un travailleur. Available at : <http://www.ucm.be/Sekretariat-social-Employeur/FAQ/Cout-d-un-travailleur/Combien-va-me-couter-un-travailleur> [Accessed May 30, 2016].
- University of Leicester, 2010. Replication, Recombination and Repair. Available at: <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/schoolscolleges/lectures/replication-recombination-and-repair-1> [Accessed October 1, 2015].
- Vera, E. & Blasco, M. a., 2012. Beyond average: Potential for measurement of short telomeres. *Aging*, 4(6), pp.379–392.
- Verdun, R.E. & Karlseder, J., 2007. Replication and protection of telomeres. *Nature*, 447(7147), pp.924–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581575>.
- Wang, F. et al., 2013. Robust measurement of telomere length in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), pp.E1906–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3666709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, Y. et al., 2013. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell death & disease*, 4, p.e950. Available at:

-
- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3877551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Web Formulas, 2015. Definition of Limit Tests. Available at: http://www.web-formulas.com/Formulas_of_Chemistry/Definition_of_Limit_Tests.aspx [Accessed August 28, 2015].
- Wentzensen, I.M. et al., 2011. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(6), pp.1238–50. Available at: <http://cebp.aacrjournals.org/content/20/6/1238.short>.
- WHO, 2009. Handbook good laboratory practice (GLP), WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Switzerland, (traduction libre). Available at : <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf> [Accessed May 15 2016].
- Wiestler, B. et al., 2013. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathologica*, 126(3), pp.443–451.
- Willeit, P. et al., 2010. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), pp.1649–1656.
- Wong, N.D., 2014. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nature reviews. Cardiology*, 11(5), pp.276–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663092>.
- Wu, J., Lu, L.-Y. & Yu, X., 2010. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & cell*, 1(2), pp.117–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3078634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xiao, W. et al., 2013. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clinical sarcoma research*, 3(1), p.10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xin, H., Liu, D. & Songyang, Z., 2008. The telosome/shelterin complex and its functions.

<i>Genome</i>	<i>biology,</i>	9(9),	p.232.	Available	at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18828880>.

Yu, L. et al., 2014. hTERT promoter activity identifies osteosarcoma cells with increased EMT characteristics. *Oncology Letters*, 7(1), pp.239–244.

Zhang, T. et al., 2013. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem cell research & therapy*, 4(3), p.70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3707041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zimmermann, S. et al., 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*, 17(6), pp.1146–1149.

Références juridiques

1. Législation

a. Internationale

Les Aspects des droits de la propriété intellectuelle qui touchent au commerce, Annexe 1C aux accords instituant l'OMC, 15 avril 1994, Marrakech.

Convention Benelux en matière de propriété intellectuelle (Marques et dessins ou modèles) du 25 février 2005, La Haye, signé le 25 février 2005, entrée en vigueur le 1 février 2007

b. Européenne

Convention du 5 octobre 1973 sur la délivrance de brevets européens, Munich, mise à jour en octobre 2013 (15e édition).

Traité sur le fonctionnement de l'Union européenne, 13 décembre 2007, signé à Lisbonne.

Directives

Directive 98/44/CE du Parlement européen et du conseil du 6 juillet 1998 relative à la protection juridiques des inventions biotechnologiques, JOUE, 30 juillet 1998, L213/13.

Directive 98/79/CE du Parlement européen et du conseil du 27 octobre 1998 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, JOUE, 7 décembre 1998, L 331/1.

Directive 2003/94/CE de la commission du 8 octobre 2003 établissant les principes et lignes

directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain, JOUE, 14 octobre 2003, L 262/22.

Directive 2004/9/CE du Parlement européen et du conseil du 11 février 2004 concernant l'inspection et la vérification des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), JOUE, 20 février 2004, L50/28.

Directive 2004/10/CE du Parlement européen et du conseil du 11 février 2004 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques, JOUE, 20 février 2004, L50/44.

Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains, JOUE, 7 avril 2004, L 102/48.

Directive du 14 avril 2016 relative à la protection des secrets d'affaires contre l'obtention, l'utilisation et la divulgation illicites, P8_TA-PROV(2016)0131. Available at : <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+TA+P8-TA-2016-0131+0+DOC+PDF+V0//FR>

Règlements

Règlement CE n° 1394/2007 du parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004, JOUE, 10 décembre 2007, L. 324/121

Le Règlement (CE) n° 207/2009 du Conseil du 26 février 2009 sur la marque communautaire, JOUE, 24 mars 2009, p. L 78/1.

c. Belge

Codes

Code de droit économique

Code civil

Code pénal

Code des sociétés

Lois

Loi du 3 juillet 1978 relative aux contrats de travail, M.B., 22 août 1978, p. 9277.

Loi du 19 décembre 2008 relative à l'obtention et à l'utilisation de matériel corporel humain destiné à des applications médicales humaines ou à des fins de recherche scientifique.

Arrêts Royaux

Arrêté royal du 14 novembre 2001 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, M.B. 30 décembre 2008, p. 68774.

Arrêté royal du 6 mars 2002 concernant la reconnaissance des laboratoires en matière d'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE et la surveillance de la mise en œuvre des tests sur les matières chimiques, M.B., 12 mars 2002, p. 10008.

2. Doctrine

a. Revues juridiques

De Brabanter M., Licence ou recherche ? Brevet ou secret ?, ICIP-Ing.Cons. – n°4, 1980.

De Gryse E., "licentieovereenkomsten", OBO, afl. 58, 29 septembre 2003.

Wyckaert M., Grenson C., Cornil L., De Bauw H., Dewandeleer D., "het zakengeheim : een voorstelling in vier bedrijven...", cah. jur., 1/2011.

Kaesmacher D., Maeyaert P., Mottet A., Philipsen G., Ryckeboer L. et Neefs K., "Protection of trade secrets through IPR and unfair competition law", ICIP-Ing.Cons. – n°3, 2010.

Andries K., "Geheimhoudingsovereenkomsten", I.R.D.I., 2010.

Buydens M., « la proposition de directive du 28 novembre 2013 du parlement européen et du conseil sur la protection des savoir-faire et des informations commerciales non divulgués (Secrets d'affaires) contre l'obtention, l'utilisation et la divulgation illicites : un premier commentaire », cah. jur., 2014/2.

De Vreese J., Willems J., "Hoe uw knowhow veiligstellen?", Oriëntatie, 2015/10.

b. Ouvrages collectifs

- Vannes V. (coord.), *Clauses spéciales du contrat de travail : utilité, validité, sanction : actes du colloque organisé à Louvain-la-Neuve le 30 avril 2003 / par la Conférence du Jeune Barreau de Nivelles, Bruxelles, Bruylant, 2003, 359 p.*
- Glansdorff F., Roels F., Cattaruzza J., etc, *Droit des affaires en évolution – que dire ou ne pas dire avant de conclure un contrat?, institut des juristes d’entreprise, Bruxelles, Bruylant, 2006, 452 p.*
- Kaesmacher D. (coord.), *Les droits intellectuels, Bruxelles, Larcier, 2007, 632 p.*
- X, *Guide juridique de l’entreprise – Traité théorique et pratique (2e éd.), Kluwer, 2007.*
- Neven J.F., Cornu E., Carlier E., e.a. (dir.), *le patrimoine intellectuel de l’entreprise : protection des actifs incorporels de l’employeur et droit et obligations des travailleurs, Bruxelles, Larcier, 2010, 236 p.*
- Ballester Rodés A., Bostedt F., Dobrucki B. et al., *La jurisprudence des Chambres de recours de l’Office européen des brevets, L’Office européen des brevets, Septembre 2013 (7e éd).*
- Cassiers V., Gilson S. (coord.), *L’entreprise et le secret, Bruxelles, Larcier, 2014, 327 p.*
- Demolin P., Hawkes L., Simplaere B., *La distribution commerciale, Bruxelles, Larcier, 2014, 390 p.*

c. Monographies

- Serra Y., *L’obligation de non concurrence dans le droit des contrats, Sirey, Paris 1970, 221 p.*
- Mathély P., *le droit européen des brevets d’invention, Paris, Librairie du Journal des Notaires et des Avocats, 1978, 466 p.*
- Mousseron J.M., *Traité des brevets : 1844-1968-1978, Washington, Munich, Luxembourg, Paris, Librairies techniques, 1984, 1097 p.*
- Bergmans B., *La protection des innovations biologiques, une étude de Droit comparé, Bruxelles, Larcier, 1991, 507 p.*
- Buydens M., *Droit des brevets d’invention et protection du savoir-faire, Bruxelles, Larcier, 1999, 421 p.*
- Van Couter Y. et Vanbrabant B., *Handboek Licentieovereenkomsten, Bruxelles, Larcier, 2008, 392 p.*

Chemtob M.C., Gallochat A., La brevetabilité des innovations biotechnologiques appliquées à l'Homme, Paris, Tec & Doc, 2006 ; 232 p.

Remiche B., Cassiers V., Droit des brevets d'invention et du savoir-faire : créer, protéger et partager les inventions au XXI^e siècle, Bruxelles, Larcier, 2010, 742 p.

Gilson S., Rosier K., Roger A., Palate S., Secret et loyauté dans la relation de travail, Waterloo, Kluwer, 2012, 245 p.

3. Jurisprudence

a. Européenne

C.E.D.H., 16 février 2000, Aman c. Suisse, §65

C.R.T., 14 mai 1985, T-36/83, JOOEB, 1986, p. 295.

C.R.T., 27 mars 1986, T-144/83, JOOEB, 1986, p. 301.

C.R.T., 14 octobre 1987, T-116/85, JOOEB, 1989, p. 13.

C.R.T., 31 août 1990, T-60/89, JOOEB, 1992, p. 268.

C.R.T., 9 novembre 1994, T-74/93, JOOEB, 1995, p. 712.

C.R.T., 21 février 1995, T-356/93, JOOEB, 1995, p. 545.

C.R.T., 14 février 1996, T-39/93, JOOEB, 1997, p. 134.

C.R.T., 31 octobre 2001, T-1080/99, JOOEB, 2002, p. 568.

b. Belge

C.A., 11 février 1993, J.T., 1993, p. 359.

C.E., 13 juillet 1993, J.L.M.B., 1993, p. 1442.

Cass., 12 juillet 1917, Pas., 1918, I, p. 65.

Cass., 7 mai 1984, J.T.T., 1984, p. 362.

Cass., 13 septembre 2001, R.W., 1991-92, p. 882.

Cass., 23 janvier 2015, D.A.O.R., 2015, liv. 3, p. 18.

C. trav. Liège, 8 janvier 2004, J.T.T., 2004, p. 331.

Bruxelles, 17 septembre 2004, Ing.- Cons., 2004, p. 367.

Bruxelles, 16 juin 2006, Ing.-Cons., 2006, p. 503.

Civ. Anvers, 28 mai 1993, Ing.-Cons., 1995, p. 34.

Civ. Liège, 10 février 1999, Ing.-Cons., 1999, p. 434.

Civ. Liège, 7 janvier 2005, I.R.D.I., 2005, p. 157.

Civ. Bruxelles, 28 novembre 2008, I.R.D.I., 2009, p. 147.

