

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu publiquement le 18 septembre 2020 à 17 heures  
Par Mme Alice Danckaert**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990 tient lieu de  
THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Développement d'une méthode de détection de la  
contamination virale au sein de l'unité de préparation du CHU de  
Lille suite à un essai clinique de thérapie génique**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Pascal Odou**  
Pharmacien, Professeur des Universités –  
Praticien Hospitalier  
Faculté de pharmacie - Université de Lille  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

**Directeur de mémoire :**

**Madame le Docteur Marine Pinturaud**  
Pharmacien, Praticien Hospitalier  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

**Asseseurs :**

**Madame le Professeur Anne Goffard**  
Medecin, Professeur des Universités –  
Praticien Hospitalier  
Faculté de pharmacie - Université de Lille  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille - Institut Pasteur de Lille

**Monsieur le Professeur Etienne Brochot**  
Pharmacien, Maitre de Conférence des Universités –  
Praticien Hospitalier  
UFR de pharmacie - Université Picardie Jules Verne  
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens





3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSSE	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique

M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques

M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie

M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais



M.	OSTYN	Gaël	Anglais
----	-------	------	---------

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

## Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur Pascal Odou,**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **A Madame le Docteur Marine Pinturaud,**

Je te remercie pour ce travail et pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai été très heureuse de travailler avec toi et je te remercie sincèrement pour tes conseils, ton écoute, ta disponibilité et surtout ton soutien en toutes circonstances. Sois assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **A Madame le Professeur Anne Goffard,**

Pour me faire l'honneur de juger cette thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à ce travail, merci de m'avoir fait profiter de votre expertise en virologie et d'avoir largement contribué à la réalisation de ce projet. Mes connaissances en virologie et en PCR n'auront jamais été aussi poussées.

## **A Monsieur le Professeur Etienne Brochot,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Soyez assuré de tout mon respect et de toute ma considération.

## **A Monsieur le Docteur Anthony Martin Mena,**

Merci pour ton aide et tes connaissances.

## **A Madame le Docteur Michèle Vasseur,**

Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre relecture et vos précieux conseils pour la bonne réalisation de ce travail.

**A Monsieur le Professeur Nicolas Simon,**

Je vous remercie pour vos conseils avisés. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon respect.

**A Madame Peggy Bouquet,**

Merci de ta gentillesse et de ton accueil. Les analyses n'auraient pas pu avoir lieu sans ton aide.

**A l'équipe de l'UPCC,**

Merci pour tout ce que vous m'avez appris pendant mon stage et de votre aide pour la réalisation de ce projet,

**A ma famille,**

Merci à vous pour tous ces moments réunis, qui sont si importants.

**À mes parents,**

Pour tout l'amour que vous me portez, et votre soutien indéfectible. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir. Vous êtes mes piliers, je vous remercie d'être toujours là pour moi, et d'avoir fait de mon bien-être une priorité.

**A ma sœur, Hortense,**

On ne te remplacera jamais, ma vie sans toi aurait été totalement différente. Le quotidien avec toi est inattendu.

Je te remercie de me supporter autant que je le fais. Si j'en suis là, c'est grâce à ton soutien lors de nos soirées BU, lorsque tu passais ta P1 et moi l'internat. Je serais toujours là pour toi.

**A ma grand-mère, Jeannine,**

Tu m'as élevée et entourée d'amour. Tu m'as appris à profiter de la vie comme elle venait, et à apprécier les moments les plus simples.

**A mes amis de la faculté de Lille,**

**Ségolène, Perrine, Léa, Anne Cécile, Cédric, Aurélie, Lina, Valentine, et tous ceux qui ont fait partie un jour de la « Team Pharma »,**

Merci de toutes ces années de fac passées en votre compagnie, je n'oublierais jamais tous ces moments en amphi, en TP, et à l'extérieur de la Fac. En particulier, cette rencontre si atypique avec toi, Ségolène. Nous nous sommes créé tellement de souvenirs qu'il serait impossible de les rappeler ici. J'espère que cette amitié durera éternellement.

**A tous mes Co-internes,**

Je vous remercie pour tous ces moments passés avec vous, j'espère que les souvenirs de ces quatre dernières années vous marqueront autant que moi.

Une pensée particulière pour Julie, Marion, Marie Caroline, Victoria et Matthieu. Quelle chance de vous avoir rencontré et quel bonheur que vous restiez tous dans la région, je vous avais prévenu !

**A mes copines Lilloises,**

**Astrid, Clémence, Mélanie,**

Votre joie de vivre embellie mes journées, notre quatuor restera inséparable. Vous êtes mon oxygène après les semaines difficiles. A tous nos futurs voyages et au prosecco !

**A tous ceux que je n'ai pas cités, mais qui savent qu'ils comptent énormément pour moi, merci.**





## Index des figures

- FIGURE 1** : Les différentes voies de thérapie génique
- FIGURE 2** : Structure d'un CAR-T Cell
- FIGURE 3** : Cycle de vie d'un vecteur viral idéal pour la thérapie génique comparé à celui d'un virus naturel
- FIGURE 4** : Génome de l'Adénovirus
- FIGURE 5** : Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique
- FIGURE 6** : Modification génique du rAd-IFN
- FIGURE 7** : Présentation de l'emballage et flacon du rAd-IFN
- FIGURE 8** : Circuit du produit rAd-IFN et zones à risques au sein de notre Zone à Atmosphère Contrôlée
- FIGURE 9** : Manipulation du rAd-IFN et mise en seringue complétée
- FIGURE 10** : Ecouvillon en coton sec et écouvillon en polyester avec milieu de transport
- FIGURE 11** : Dilutions du rAd-IFN réalisées au 10<sup>ème</sup>
- FIGURE 12** : Préparation des dilutions du rAd-IFN dans l'isolateur de l'UPCC
- FIGURE 13** : Mode de prélèvement pour la réalisation des prélèvements surfaciques et mode de conservation
- FIGURE 14** : Plan de prélèvements virologiques au sein de l'UPCC
- FIGURE 15** : Les différentes étapes d'extraction et photo des colonnes de silice
- FIGURE 16** : Etapes du cycle d'une PCR en fonction de la température et du temps
- FIGURE 17** : Plan de répartition des échantillons dans les puits de la plaque de PCR
- FIGURE 18** : Analyse de la gamme standard externe du kit par qPCR
- FIGURE 19** : Analyse de la courbe standard
- FIGURE 20** : Analyse des dilutions au 10<sup>ème</sup> à partir du produit pur par qPCR
- FIGURE 21** : Concentration d'ADN viral analysée en fonction de la gamme de dilution
- FIGURE 22** : Analyse des tests positifs, négatifs et provoqués par qPCR en fonction du dispositif de prélèvement
- FIGURE 23** : Analyse des prélèvements surfaciques par qPCR
- FIGURE 24** : Analyse des prélèvements surfaciques positifs par qPCR

## Index des tableaux

- TABLEAU 1** : Caractéristiques des principaux virus utilisés en thérapie génique
- TABLEAU 2** : Groupes de risques et classes de confinement selon le HCB
- TABLEAU 3** : Résultats de la gamme de dilution par qPCR
- TABLEAU 4** : Résultats du nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les prélèvements positifs
- TABLEAU 5** : Résultats du nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les prélèvements de contamination provoquée
- TABLEAU 6** : Résultats de la présence de rAd-IFN dans les prélèvements surfaciques en fonction du dispositif de prélèvement
- TABLEAU 7** : Nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les prélèvements surfaciques positifs

# Index des annexes

**ANNEXE 1** : Plan de prélèvement virologique de surface dans les isolateurs de l'UPCC et analyse à l'Institut Pasteur

**ANNEXE 2** : Protocole du kit d'extraction kit QIAamp® DNA Mini Kit

**ANNEXE 3** : Protocole du kit de PCR Adénovirus r-GENE® Biomérieux

## Liste des abréviations

AC : Anticorps

AdV5 : Adénovirus de type 5

ADN : AcideDésoxyriboNucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CAR-T Cells : Chimeric Antigen Receptor Cells T

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

COMP : Compresse

COT : écouvillon Coton

Ct : Threshold Cycle

DASRI : Déchets d'Activité de Soins à Risque Infectieux

DCI : Dénomination Commune Internationale

EPI : Equipement de Protection Individuelle

HCB : Haut Conseil des Biotechnologies

INF : Interféron

IC : Internal Controle

IPL : Institut Pasteur de Lille

LD : Ligne Directive

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PBS : Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

POL : écouvillon polyester

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

PVC : PolyChlorure de Vinyle

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

QS : Quantification Standard

REF : Référence

RPM : Rotation Per Minute

SC : Sensitivity controle

SFPO : Société Française de Pharmacie Oncologique

UPCC : Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>21</b>
<b>Partie I : De la thérapie génique à la contamination virale .....</b>	<b>23</b>
<b>A) Définition.....</b>	<b>23</b>
<b>B) La thérapie génique ex vivo .....</b>	<b>24</b>
<b>C) Thérapie génique in vivo.....</b>	<b>26</b>
<b>D) Les vecteurs viraux .....</b>	<b>27</b>
1) Caractéristiques des vecteurs viraux.....	27
2) Les différents types de virus utilisés en thérapie génique .....	30
3) Les Adénovirus .....	30
<b>E) Description de l'essai clinique de thérapie génique Trizell .....</b>	<b>32</b>
<b>F) Risque de contamination virale et circuit mis en place pour le limiter .....</b>	<b>34</b>
1) Encadrement réglementaire pour la manipulation du rAd-IFN.....	34
2) Le risque de contamination virale au sein de l'unité de préparation .....	37
3) Circuit pharmaceutique mis en place au CHU de Lille.....	39
<b>Partie II : Développement de la méthode de détection.....</b>	<b>43</b>
<b>A) Choix des méthodes pour la détection du virus et pour les prélèvements de surface dans nos locaux.....</b>	<b>43</b>
1) Méthodes de détection de l'adénovirus.....	43
a) Choix de la technique de détection.....	43
b) Choix du kit de PCR.....	44
2) Méthodes de prélèvement surfacique dans nos locaux de préparation .....	45
a) Choix du dispositif de prélèvement.....	45
b) Choix du milieu de conservation .....	47
c) Mode de conservation .....	48
<b>B) Mode opératoire .....</b>	<b>48</b>
1) Dilutions du produit pur.....	48
2) Prélèvements surfaciques dans nos locaux de préparation.....	50
a) Mode de prélèvement.....	50
b) Plan de prélèvements viraux surfaciques .....	51
c) Test positif, test négatif et test provoqué .....	52
3) Analyse des dilutions et prélèvements surfaciques .....	53
a) Extraction .....	53
b) qPCR .....	55

<b>C) Résultats.....</b>	<b>57</b>
1) Interprétation de la qPCR .....	57
2) Gamme des standards externes d'adénovirus .....	57
3) Analyse des échantillons par qPCR.....	58
a) Conditions de validation .....	58
b) Analyse des résultats pour les dilutions de rAd-IFN .....	59
c) Analyse des résultats pour les tests positifs, négatifs et provoqués .....	61
d) Analyse des résultats pour les prélèvements surfaciques .....	63
e) Quantification des échantillons positifs .....	65
<b>Partie III : Discussion.....</b>	<b>67</b>
A) Discussion sur notre méthodologie.....	67
1) La méthode de détection par qPCR.....	67
2) L'étape d'extraction .....	69
3) Le plan de prélèvements.....	70
4) La méthode de prélèvement .....	71
B) Discussion sur les résultats des analyses par qPCR .....	73
1) Validation de la méthode de détection .....	73
2) Analyse des résultats pour les prélèvements surfaciques .....	73
3) Comparaison des résultats en fonction du dispositif de prélèvement .....	75
4) Quantification de notre dilution et des prélèvements positifs.....	76
C) Perspectives .....	77
<b>Conclusion : .....</b>	<b>79</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>81</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>85</b>

# Introduction

Les pharmacies hospitalières sont amenées à prendre en charge un nouveau type de médicament appelé « Médicament de thérapie innovante » (MTI) ou Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) dont les médicaments de thérapie génique.

La responsabilité de ces nouvelles thérapies revient aux pharmacies à usage intérieur (PUI) : elles doivent s'adapter pour stocker, manipuler et assurer la gestion des déchets tout en maîtrisant le risque pour le personnel et l'environnement.

De nombreux essais cliniques sont en cours concernant la thérapie génique : 3001 essais en 2019, dont 66,8% pour le traitement des cancers (1). Cependant, ces traitements ne sont pas dénués de risque car ils utilisent des cellules ou vecteurs génétiquement modifiés qui sont considérés comme Organismes Génétiquement Modifiés (OGM).

Le CHU de Lille participe à l'essai de thérapie génique Trizell, dont le médicament testé utilise comme vecteur un adénovirus génétiquement modifié, nécessitant une manipulation en salle blanche avant injection. Cependant, à l'heure actuelle nous ne disposons pas de locaux dédiés à ce type de médicament à la pharmacie, nous nous sommes donc interrogés sur le risque de contamination virale de nos locaux de préparation et le risque de contamination croisée avec les autres préparations.

Un circuit pharmaceutique spécifique est mis en place pour ces médicaments afin de limiter ces risques. Toutefois, nous n'avons actuellement aucun moyen à notre disposition pour évaluer l'efficacité des méthodes de confinement et de décontamination mises en place.

L'objectif principal de ce travail est de développer une méthode de détection de l'adénovirus modifié contenu dans notre médicament. L'objectif secondaire sera de définir une méthode de prélèvements de nos surfaces efficace et réalisable à chaque étape du circuit du médicament de thérapie génique.



# Partie I: De la thérapie génique à la contamination virale

## **A) Définition**

Les MTI représentent l'une des principales voies d'innovation thérapeutique actuelle, prometteuse pour de nombreux patients dépourvus de traitement ou parfois sans autre alternative. Au vu de l'essor des biothérapies, les MTI seront amenés à prendre une place de plus en plus importante dans notre offre de soins à l'hôpital.

Quatre classes de MTI ont été définies par le règlement européen 1394/2007 (2): les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, les médicaments combinés de thérapie innovante, et enfin, les médicaments de thérapie génique sur lesquels nous allons nous concentrer dans ce travail.

La thérapie génique est définie par l'annexe I, partie IV, de la directive 2001/83/CE (3):

*« C'est un médicament biologique dont la substance active contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique et son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence ».*

Les trois piliers de la thérapie génique sont :

- Le gène : le but est d'insérer une séquence d'acide nucléique qui est déficiente ou mutée chez le patient traité, ou d'importer un gène codant pour une protéine, visant à apporter une fonction utile pour combattre la maladie ou en améliorer les symptômes. On parle aussi de transgène ou de «gène médicament» ;
- Les cellules cibles : elles dépendent du type de pathologie à traiter, si celle-ci est localisée ou disséminée et s'il s'agit de cellules quiescentes ou en division ;
- Le vecteur : il sert à transporter le transgène et cibler les cellules destinataires.

Les gènes médicaments sont considérés comme des OGM, définis par la directive 2001/18/EC de l'Union Européenne comme « organismes, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle » (3).

La thérapie génique est en plein essor, en particulier dans le traitement du cancer avec 2016 essais cliniques en 2019, et le traitement des maladies orphelines avec 359 essais cliniques en 2019 (4).

Il existe deux voies de thérapie génique :

- Ex vivo : prélèvement et modification génétique des cellules d'un patient en laboratoire, avant leur réinjection à ce même patient.

- In vivo : administration directe du gène thérapeutique au patient.

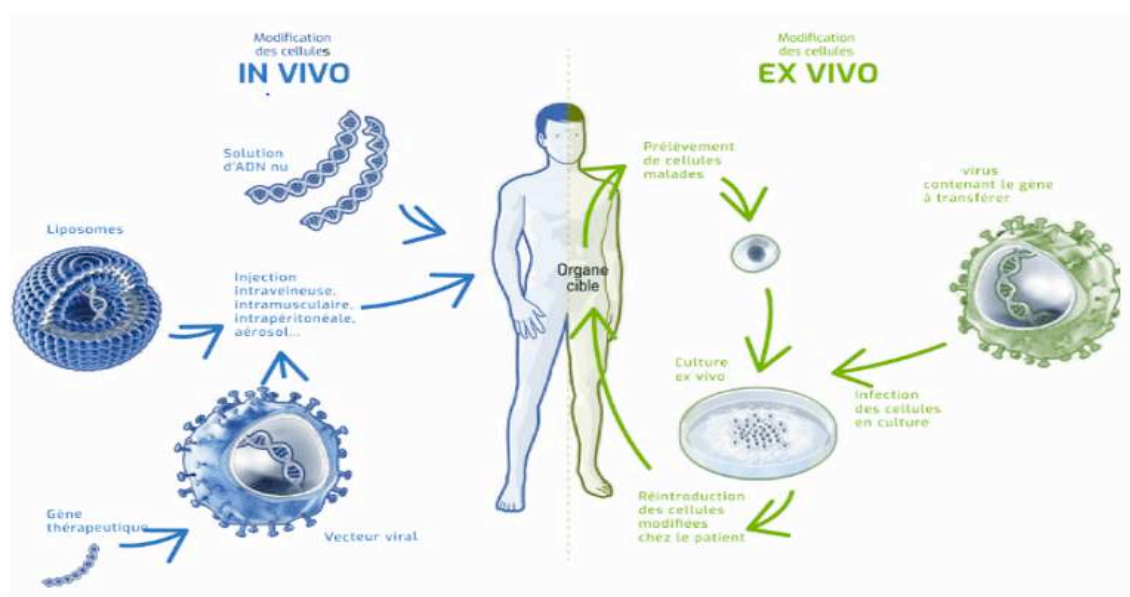


Figure 1 : Les différentes voies de thérapie génique

© Illustration : Journal du CNRS

## ***B) La thérapie génique ex vivo***

Les cellules cibles du malade sont prélevées et sélectionnées en laboratoire pour obtenir un produit de départ homogène et purifié. Elles sont ensuite mises en contact avec un vecteur contenant le gène d'intérêt (étape de transduction) puis mises en culture pour augmenter leur nombre. Elles sont enfin réinjectées au patient pour exercer leur action de «gène médicament» in vivo.



Cette technique est utilisée pour la production des Chimeric Antigen Receptor T-Cells (CAR-T Cells). Ce terme désigne les lymphocytes T prélevés au patient par leucaphérèse et modifiés génétiquement ex vivo afin d'exprimer une protéine chimérique spécifique. Cette protéine est située à la surface des lymphocytes T et permet la reconnaissance des récepteurs des cellules ciblées. Elle possède aussi un domaine interne qui permet l'activation cytotoxique des lymphocytes (5).

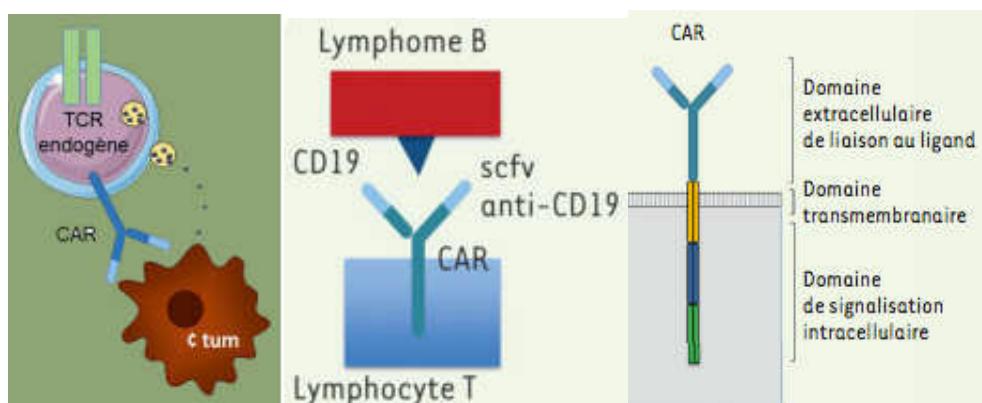


Figure 2 : Structure d'un CAR-T Cell (5)

A l'heure actuelle, les deux CAR-T Cells commercialisés en France et ciblant le récepteur CD19 sont :

- Le **Yescarta**<sup>®</sup> (axicabtagene ciloleucel) du laboratoire Gilead, qui a obtenu son AMM européenne en 2018 dans le traitement de 3<sup>e</sup> ligne ou plus du lymphome diffus à grandes cellules B ou du lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B, réfractaire ou en rechute. Il s'agit de lymphocytes T autologues modifiés génétiquement ex vivo par un vecteur viral de type lentivirus pour les munir du récepteur anti-CD19. La liaison des CAR-T anti-CD19 aux cellules cancéreuses et aux lymphocytes B, initie la cascade de signalisation immunitaire. Celle-ci conduit à l'activation, la prolifération, à l'acquisition de fonctions effectrices immunitaires, à la sécrétion des cytokines et chimiokines pro inflammatoires, et pour finir à l'apoptose des cellules cancéreuses (6).

- Le **Kymriah**<sup>®</sup> (Tisagenlecleucel-T) du laboratoire Novartis, qui a obtenu son AMM européenne en 2019 dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques à cellules B réfractaires avant 26 ans, en rechute après greffe ou après la deuxième rechute ou plus et pour le traitement des adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en rechute ou réfractaire après une deuxième ligne (7). Il s'agit aussi de lymphocytes T autologues anti-CD19 avec le même mécanisme d'action que le Yescarta<sup>®</sup>, mais à la différence d'être

modifiés génétiquement par un vecteur rétroviral et possédant un domaine d'activation intracellulaire différent (5).

Le principal avantage de la thérapie génique *ex vivo* est l'absence de contact direct entre le patient et le vecteur. Ainsi, le patient ne développera pas de réaction immunologique contre le vecteur, la modification génétique sera faite uniquement sur les cellules sélectionnées, sans aucune interférence avec d'autres types cellulaires *in vivo*. Seules les cellules modifiées génétiquement sont réinjectées au patient avec une concentration et une viabilité contrôlées.

Le principal inconvénient est le temps d'attente du traitement. La manipulation génétique est réalisée spécifiquement sur les cellules du patient après prélèvement, le délai d'obtention du traitement est en moyenne de 3 à 4 semaines après l'aphérèse, ce qui peut représenter une perte de chance pour le patient (5).

### ***C) Thérapie génique in vivo***

La deuxième technique de thérapie génique consiste à administrer directement au patient le vecteur contenant la séquence génétique modifiée, soit :

- par voie systémique en intra veineuse ou intra artérielle s'il s'agit d'une maladie touchant plusieurs tissus ou si le tropisme du vecteur le permet ;
- par injection locale, directement au sein des tissus ciblés.

Le **Luxturna**<sup>®</sup> (voretigène néparvovec) utilise cette technique, il a obtenu une AMM européenne en 2018 pour le traitement de la dystrophie rétinienne héréditaire. On injecte, directement dans l'espace sous rétinien, un vecteur viral adéno-associé de sérotype 2 qui délivre la séquence génétique codant pour la protéine hRPE65, mutée dans cette maladie monogénique héréditaire (8).

L'**Imlygic**<sup>®</sup> (talimogène laherparepvec ou T-VEC) est un autre traitement utilisant la thérapie génique *in vivo*. Il a obtenu son AMM européenne en 2015 dans le traitement du mélanome non résecable avec métastases régionales ou à distance, sans localisation osseuse, cérébrale, pulmonaire ou viscérale. Il s'agit d'un virus oncolytique : c'est un virus herpétique génétiquement modifié qui va infecter et se multiplier sélectivement dans les cellules cancéreuses. Il va provoquer la production de la protéine GM-CSF, stimuler la réponse immunitaire générale, et induire la lyse cellulaire des cellules cancéreuses infectées.

Le **rAd-IFN** (Nadofaragene firadenovec) est un vecteur adénoviral modifié génétiquement, apportant la séquence génétique de l'interféron aux cellules qu'il infecte, il est utilisé dans l'essai clinique de thérapie génique *in vivo* dénommé « Trizell » dans le traitement du mésothéliome pleural. Notre travail portera sur la détection surfacique de ce virus modifié.

L'avantage de la thérapie génique *in vivo* est l'absence de prélèvement cellulaire chez le patient. Le traitement n'est pas spécifique au receveur et est préparé industriellement à l'avance, il est disponible plus rapidement.

Cependant, l'injection du vecteur directement chez le patient entraîne un risque d'insertion aléatoire de la séquence génique dans d'autres types cellulaires, à la base non ciblés, avec des conséquences non négligeables comme l'apparition de mutations ou l'activation de proto-oncogènes. Le risque de réaction immunitaire contre le vecteur doit aussi être pris en compte.

## ***D) Les vecteurs viraux***

L'objectif des différents vecteurs utilisés est de compacter, protéger l'ADN et de promouvoir son passage à travers la membrane plasmique.

Il existe différents types de vecteurs permettant de transporter la séquence recherchée jusqu'aux cellules ciblées : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux comme les systèmes lipidiques ou les plasmides nus. Nous ne détaillerons ici que les vecteurs viraux puisque notre travail porte sur ce thème.

Les virus sont des agents infectieux qui possèdent un type d'acide nucléique, ADN ou ARN, pouvant se répliquer uniquement en pénétrant dans une cellule et en utilisant sa machinerie cellulaire.

Les virus sont les vecteurs les plus utilisés à ce jour, ils ont la capacité de pénétrer naturellement dans les cellules et sont employés dans 67,3% des essais cliniques de thérapie génique en 2019 (9).

### **1) Caractéristiques des vecteurs viraux**

Chaque vecteur viral possède des propriétés différentes et pour chaque stratégie de traitement, le type de virus utilisé sera choisi en fonction :

- du type cellulaire à cibler, selon le tropisme viral ;

- de la taille du gène d'intérêt à apporter ;
- de l'expression voulue dans le temps : correspond au caractère intégratif du virus ;
- de sa virulence et sa multiplication : correspond au caractère répliatif du virus.

Le cycle viral est caractérisé par deux phases :

- l'infection : c'est à dire la pénétration de l'ADN viral dans la cellule, qui peut être suivie ou non de l'intégration à son génome en fonction du virus.
- la répliation : c'est la production de particules virales capables d'infecter d'autres cellules à leur tour.

Les virus intégratifs s'insèrent dans le noyau puis dans la séquence génomique des chromosomes des cellules hôtes. La modification du patrimoine génétique se reportera également aux cellules filles lors de la division cellulaire. Le traitement aura une action persistante.

A l'inverse, les virus non intégratifs ne s'insèrent pas dans la séquence génomique de l'hôte. L'information ne sera pas transmise aux cellules filles mais demeure dans les cellules quiescentes présentes au moment du traitement. Ainsi, les risques de recombinaison aléatoire avec l'ADN et de transformation maligne des cellules sont réduits. Par contre, l'effet du traitement disparaîtra progressivement avec la mort des cellules infectées (10).

Les virus répliatifs ont la capacité de se multiplier, produire de nouvelles particules virales et se propager chez l'hôte. Ce caractère répliatif peut être conservé et utile au mécanisme d'action. C'est le cas des virus oncolytiques qui doivent se multiplier pour être efficaces et détruire les cellules cancéreuses (exemple du T-VEC<sup>®</sup>).

En thérapie génique, les principaux virus utilisés sont modifiés génétiquement pour devenir non répliatifs, perdre leur virulence et permettre une tolérance de l'organisme.

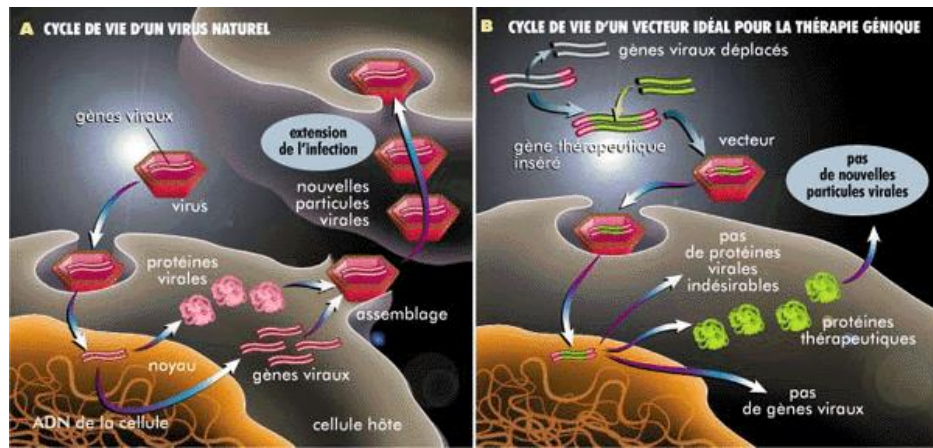


Figure 3 : Cycle de vie d'un vecteur viral idéal pour la thérapie génique comparé à celui d'un virus naturel (11)

Mais selon la World Health Organisation 2004, les vecteurs viraux modifiés génétiquement pour les rendre non répliquatifs présentent tout de même un risque de recombinaison spontanée avec d'autres virus naïfs de même type qui possèdent encore la capacité de se répliquer, le risque de virulence n'est donc pas nul (12).

Quelques accidents ont, en effet, marqué le début de la thérapie génique, comme la mort d'un patient inclus dans un essai clinique en Pennsylvanie en 1999. Il est décédé d'une défaillance multiviscérale suite à plusieurs réactions inflammatoires après injection d'un adénovirus modifié utilisé dans le traitement du déficit en ornithine transcarbamylase.

L'autre risque est l'insertion aléatoire du transgène à proximité d'un proto-oncogène. Les proto-oncogènes sont des gènes normalement présents dans le génome mais, qui suite à une transformation ou une activation, peuvent conférer un phénotype cancéreux à une cellule.

Lors d'un essai clinique dans le traitement de la maladie génétique de déficience immunitaire combiné sévère liée à l'X, l'insertion aléatoire du gène cible porté par un rétrovirus a entraîné une activation du gène LMO2. C'est un gène normalement inactif et impliqué dans l'hématogénèse. L'activation du proto-oncogène a provoqué une leucémie chez deux enfants en 2002 à l'Hôpital Necker-Enfants Malades (13).

Ainsi dans le cadre de la thérapie génique, les vecteurs doivent obligatoirement être modifiés génétiquement pour être délévés de leurs régions génomiques pathogènes en les remplaçant par le gène d'intérêt. Le but étant de rendre les vecteurs viraux les plus silencieux possible pour le système immunitaire et de réduire le risque d'insertion aléatoire grâce au choix du vecteur viral et à l'expérience des chercheurs (14).

## 2) Les différents types de virus utilisés en thérapie génique

Type de Virus	Tropisme cellulaire	Intégratif	Expression dans le temps	Réponse immunitaire	Taille maximal du transgène
Rétrovirus (Yescarta®)	Uniquement les cellules en division	oui	Persistante avec transmission aux cellules filles	faible	8kb
Lentivirus (Kymriah®)	Large spectre	oui	Persistante	faible	8kb
Adénovirus (rAd-IFN)	Large spectre	non	Transitoire jusqu'à la mort des cellules infectées	Réponse inflammatoire	30kb
Adénovirus associé (Luxturna®)	Large spectre	rarement (<10%)	Long terme dans les cellules post mitotiques	faible	4,8kb
Herpès simplex virus (Imlygic®)	Large (neurotropisme possible)	non	Transitoire	Neurotoxicité suspectée	30 kb

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux virus utilisés en thérapie génique (11) (15)

## 3) Les Adénovirus

Les adénovirus humains appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Il existe 7 espèces de A à G incluant au moins 57 sérotypes décrits, tous infectieux pour l'homme.

Ils entraînent des infections respiratoires, oculaires et gastro-intestinales souvent bénignes. Cependant, chez les patients immunodéprimés, les infections peuvent être sévères voire mortelles : pneumonie, hépatite, méningo-encéphalite, pancréatite et infections disséminées. Chez ces patients, la sévérité dépend de l'organe touché, du sérotype d'adénovirus et du profil patient (âge, comorbidités, antécédents...) (16).

Ce sont des virus non enveloppés, à capsidie icosaédrique, dont le génome est constitué d'un double brin d'ADN d'environ 36000 paires de bases. Leur tropisme très large leur permet d'infecter une grande diversité de cellules (10).

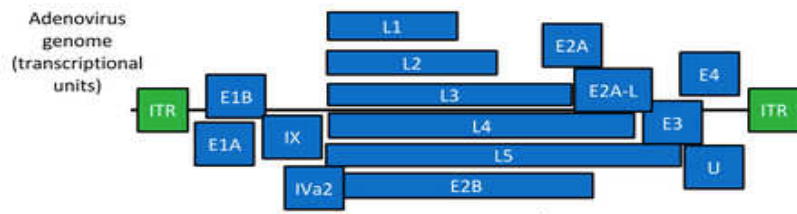


Figure 4 : Génome de l'Adénovirus

Source Addgene

Les régions E1A, E1B, E2 et E4 du génome sont essentielles à la réplication, le gène E3 est indispensable au cycle viral.

Il s'agit du vecteur viral le plus utilisé dans les essais de thérapie génique en 2019 (18,5%) (9), et l'un des plus efficaces dans le transfert de gènes car il présente de nombreux avantages (17):

- Un large tropisme cellulaire qui garantit une expression transitoire à la fois dans les cellules quiescentes et en division.
- Il est non intégratif, ce qui limite le risque de mutation, l'instabilité génétique et l'activation de proto-oncogènes.
- Il possède une capacité d'insertion de transgène de grande taille jusqu'à 30 kilobases.
- Il est productible facilement et en grande quantité (18,19).

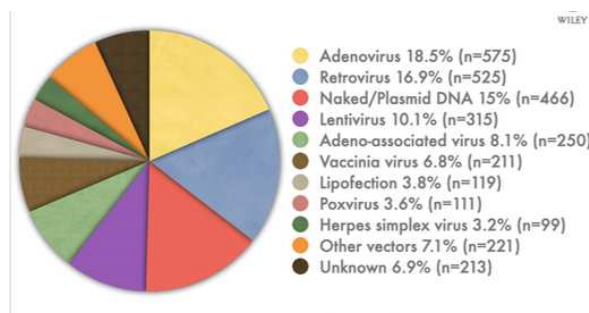


Figure 5: Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique

Journal of gene medicine 2019

L'inconvénient principal est le risque de réaction immunitaire. Avant injection, il est possible que le patient possède déjà des anticorps dirigés contre un adénovirus de même sérotype provenant d'une exposition antérieure, ce qui conduirait à une activation du système immunitaire, et potentiellement, à une neutralisation du traitement par les anticorps. Après injection, le patient peut produire des anticorps dirigés contre les antigènes de la capside et des hexons de l'adénovirus, empêchant parfois la réintroduction du traitement (20).

Concernant les risques de manipulation de ce type de virus, les adénovirus sont des virus très stables dans l'environnement qui peuvent survivre sur les surfaces inanimées sèches jusqu'à 3 mois (21). L'inhalation de cinq particules d'adénovirus de sérotype 4 pourrait suffire à entraîner une infection chez les sujets non immunisés (22).

L'adénovirus de type 5 (AdV5) est le vecteur utilisé dans l'essai clinique de thérapie génique Trizell pour lequel nous avons été sollicités au CHU de Lille.

## ***E) Description de l'essai clinique de thérapie génique Trizell***

L'essai Trizell est une étude clinique de phase 3 randomisée, en groupe parallèle, visant à évaluer l'efficacité et la sécurité de l'administration intra pleurale du gène de l'interféron (IFN) alpha-2b distribué grâce à un vecteur adénovirus recombinant modifié nommé rAd-IFN ou Nadofaragene firadenovec.

Il est indiqué chez les patients de plus de 18 ans atteints de mésothéliome pleural malin épithélioïde en échec thérapeutique après une ou deux lignes de traitement dont au moins l'une d'entre elle combinait un anti-folate et un sel de platine. C'est une maladie qui est associée à l'inhalation de fibre d'amiante avec une prédominance masculine de 80% liée à l'exposition professionnelle (23). En France, l'incidence est de 800 à 1000 nouveaux cas par an et la survie médiane est de 12 mois avec traitement par chimiothérapie (24).

Plusieurs études ont démontré la diminution de l'expression du gène de l'IFN dans les cellules du mésothéliome (25,26). L'IFN est une protéine de la famille des cytokines synthétisée en présence d'agents pathogènes tels que les virus, bactéries ou les cellules cancéreuses. L'IFN alpha est connu pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses, diminuer l'expression des oncogènes et stimuler le système immunitaire en activant les lymphocytes T et les cellules dendritiques (27,28).

L'injection intrapleurale du rAd-IFN est intéressante car elle permet une action au plus près de la tumeur, d'autant plus que ce type de cancer présente peu de métastases. L'IFN sera sécrété par les cellules transduites et pourra exercer ses fonctions antitumorales : stimulation du système immunitaire et induction d'apoptose.



Deux études cliniques de phase I et Ib ont déjà démontré l'intérêt et la sécurité d'utilisation de de l'adénovirus comme vecteur de l'IFN alpha dans le traitement du mésothéliome (29,30).

Dans l'essai clinique de phase III Trizell, on cherche à évaluer l'efficacité du rAd-IFN associé à un anti-métabolite, la gemcitabine, et un anti-inflammatoire, le celecoxib.

Dans l'étude, deux bras de traitement sont comparés :

- Bras 1 : rAd-IFN à J1 du premier cycle uniquement + gemcitabine à J1 et J8 + celecoxib de J1 à J14 sur un cycle de 28 jours répété jusqu'à progression.
- Bras 2 : gemcitabine à J1 et J8 + celecoxib de J1 à J14 sur un cycle de 28 jours répété jusqu'à progression.

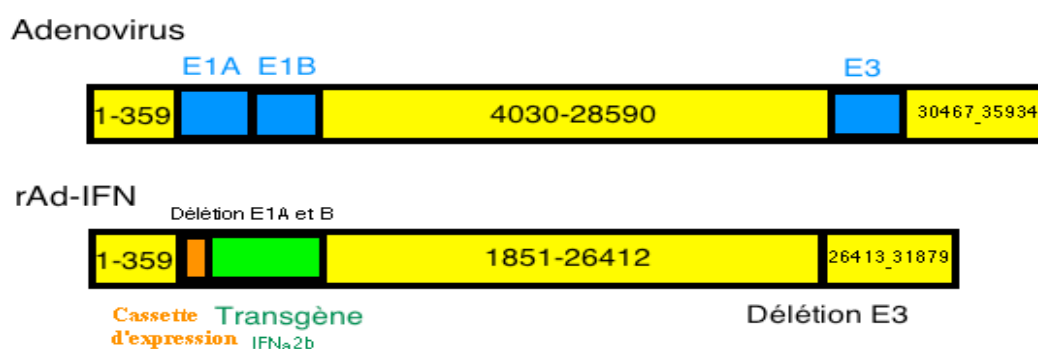


Figure 6: Modification génique du rAd-IFN

Le vecteur AdV5 est cultivé sur des lignées cellulaires HEK293. L'adénovirus est délété des fonctions virales E1A, E1B et E3 pour le rendre non répliatif (31). Ces séquences sont remplacées par :

- une cassette d'expression avec le promoteur précoce du cytomégalovirus indispensable à la fixation de l'ARN polymérase pour l'expression du transgène.
- le transgène rAd-IFN.

Concernant le risque de manipulation, le seul risque pour le personnel manipulant le rAd-IFN mentionné dans le protocole de l'étude clinique est : « l'apparition de symptômes des voies respiratoires similaires à ceux produits par le rhume ». Les conséquences d'une potentielle production d'IFN par les personnes qui seraient infectées accidentellement n'ont pas été étudiées.

Le produit est conditionné en flacon en verre de 1 millilitre contenant  $3.10^{11}$  particules virales de rAd-IFN, le flacon est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  et doit être décongelé 5 à 10 minutes avant la manipulation. Celle-ci consiste en une mise en seringue complétée avec 24mL de chlorure de sodium. Le produit fini sera injecté grâce à un cathéter intra-pleural.



Figure 7: Présentation de l'emballage et du flacon du rAd-IFN

En parallèle avec la contamination chimique des locaux de préparation des cytotoxiques, que nous ne connaissons encore peu il y a quelques années, nous nous sommes spontanément interrogés sur la potentielle contamination virale de nos locaux de préparation lors de la manipulation de ces nouveaux médicaments de thérapie génique, et notamment du rAd-IFN.

## ***F) Risque de contamination virale et circuit mis en place pour le limiter***

### **1) Encadrement réglementaire pour la manipulation du rAd-IFN**

Tout produit de thérapie génique est considéré comme un Organisme Génétiquement Modifié selon l'article L531-1 du Code de l'environnement (32), la manipulation et le confinement de ces médicaments sont encadrés par le Manuel du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB).

Ce manuel décrit quatre classes de risques et quatre classes de confinements selon l'OGM (33) :

Groupe de risque :			
Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Aucune notion que l'agent cause des pathologies chez l'homme.	<b>Agents pathogènes chez l'homme, risque pour le personnel manipulateur et dissémination dans l'environnement peu probable, prophylaxie et traitement efficace.</b>	Agents pathogènes graves chez l'homme, risque pour le personnel manipulateur et risque faible pour l'environnement, prophylaxie et traitement efficace.	Agents pathogènes graves chez l'homme, risque pour le personnel manipulateur et risque fort pour l'environnement, prophylaxie et traitement inefficace.

Classe de confinement			
C1	C2	C3	C4
<b>Opération d'OGM du groupe 1 dont le risque pour le personnel ou la santé est négligeable.</b>	Opération d'OGM du groupe 2 dont le risque pour le personnel ou la santé est faible.	Opération d'OGM du groupe 3 dont le risque pour le personnel ou la santé est modéré.	Opération d'OGM du groupe 4 dont le risque pour le personnel ou la santé est élevé.

Tableau 2 : Groupes de risques et classes de confinement selon le HCB

En ce qui concerne le rAd-IFN, il appartient **au groupe de risque 2** en phase de production et doit être fabriqué en confinement de classe 2. Cependant, il peut être manipulé en **confinement de classe 1** en contexte hospitalier selon la décision du comité scientifique du HCB, la manipulation consistant uniquement à une mise en seringue. La préparation devra être effectuée sous un poste de sécurité microbiologique de classe II ou dans un isolateur de classe A.

Le HCB a pris cette décision après avoir vérifié l'absence de réplication de l'adénovirus modifié grâce à un test de détection d'effet cytopathogène. Ce test consiste à inoculer un échantillon de  $3.10^{10}$  particules du virus sur des cellules pulmonaires A549 et à observer le nombre de cellules altérées par la multiplication de celui-ci (34).

Toutefois, le HCB évoque un « risque théorique » de recombinaison entre le vecteur rAd-IFN et un adénovirus sauvage, possible uniquement si les deux génomes se retrouvent au même moment dans une même cellule.

Selon la World Health Organisation 2004, les virus modifiés génétiquement doivent être manipulés de la même façon que s'il s'agissait du virus parent non modifié (12).

A l'heure actuelle, la manipulation des MTI au sein des PUI n'est pas encadrée réglementairement en France, elle sera probablement intégrée dans les prochaines Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) attendues cette année (35). L'ANSM met en consultation publique depuis juin 2020 un projet de ligne directrice (LD) intitulé « *LD 2 : Préparation de médicaments contenant des substances pouvant présenter un risque pour la santé et l'environnement* » qui intègre la notion de MTI (36). Les deux notions mentionnées dans ce texte sont :

- « Dans le cas où l'organisation des locaux ne permet pas d'avoir un local dédié à la manipulation des agents biologiques pour la réalisation de préparations stériles, l'utilisation des locaux dédiés à la réalisation d'autres préparations stériles peut être envisagée pour les agents biologiques classés dans le groupe 1».

- « La production par campagne dans les mêmes locaux ou zones peut être acceptée à condition d'appliquer des procédures de nettoyage, décontamination et de désinfection des locaux ou zones, des équipements et des matériels utilisés ».

Ces notions sont également mentionnées dans les seules recommandations existantes à ce jour : celles de la Société Française de Pharmacie Oncologique datant d'avril 2015 (SFPO) qui préconise les mesures à prendre aux différentes étapes du circuit du médicament de thérapie génique et recommande également l'utilisation d'un système clos compatible avec le produit de thérapie génique pour éviter sa dispersion.

## **2) Le risque de contamination virale au sein de l'unité de préparation**

L'évolution rapide de la thérapie génique et l'arrivée de ces nouvelles thérapeutiques a bouleversé les pratiques des pharmacies hospitalières dont le personnel n'est pas habitué à la manipulation de virus. Actuellement, la majorité des PUI en France ne dispose pas de salle de préparation dédiée aux MTI, ce qui peut engendrer un risque de contamination croisée avec d'autres types de préparation.

Il n'existe aucun contrôle à ce jour permettant de surveiller l'éventuelle contamination virale qui pourrait persister dans nos locaux après manipulation de ces médicaments.

Face à la pression des médecins souhaitant tester ces nouvelles thérapies prometteuses et en attendant la création de locaux de préparation dédiés à la thérapie génique, un circuit utilisant les locaux techniques actuels a été proposé.

La manipulation du produit est réalisée dans un des isolateurs de l'unité de préparation centrale des cytotoxiques (UPCC) avec l'accord du promoteur de l'étude clinique. Il est donc essentiel de s'assurer de l'absence de contamination croisée au vu du profil immunodéprimé des patients traités par chimiothérapies.

Au sein de notre unité, nous avons identifié les sources potentielles de contamination et les étapes critiques du circuit, puis nous avons défini et mis en place les moyens de prévention pour assurer un confinement optimal du produit, éviter les contaminations croisées et garantir la sécurité du personnel.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur la détection virale dans nos locaux de préparation. Le transport et l'administration du produit dans le service de soins représentent également des étapes à risque qui pourront être évaluées dans un travail ultérieur.

En se basant sur les études de contamination chimique déjà réalisées (37–39), nous supposons que les sources de contamination virale potentielles au sein de notre unité sont similaires :

- la surface externe du flacon de rAd-IFN ;
- les modalités de préparation, à savoir une mise en seringue pour notre produit ;
- la préparation en elle-même et notamment la seringue de conditionnement ;
- les déchets engendrés ayant été en contact avec le produit et leur élimination.

De même, plusieurs types d'expositions professionnelles peuvent survenir dans nos locaux de préparation :

- contact direct avec la peau lésée lors d'un bris de flacon, manipulation du flacon sans équipement de protection individuelle (EPI) ou piqûre avec une aiguille ;
- ingestion lors d'un bris de flacon ou contact des mains contaminées avec la bouche ;
- inhalation lors d'un bris de flacon ;
- injection accidentelle en cas de piqure avec une aiguille contaminée.

Les étapes critiques identifiées à la PUI, où les risques d'exposition peuvent survenir, sont (figure 8) :

- le stockage du flacon (Zone A) ;
- le transport du flacon jusqu'aux locaux de préparation (Zone B) ;
- la préparation du plateau dans la salle de stockage (Zone C) ;
- la mise en seringue du produit dans l'isolateur (Zone D) ;
- le contrôle libérateur de la seringue en assurance qualité (Zone E) ;
- la gestion des déchets OGM en salle déchets (Zone F).

En comparaison, le risque chimique est contrôlé au CHU de Lille grâce à un monitoring de la contamination chimique liée à l'utilisation de cytotoxique. Des prélèvements sont réalisés mensuellement et permettent d'analyser la présence de 10 molécules sur nos surfaces. Les préparations du rAd-IFN ayant lieu dans ces locaux, il est envisageable de reproduire le même type de contrôle en adaptant la méthode de prélèvement pour l'analyse virale et en se basant sur un plan de prélèvement similaire.

### 3) Circuit pharmaceutique mis en place au CHU de Lille

Lors de l'arrivée du rAd-IFN, l'équipe pharmaceutique a dû s'adapter pour mettre en place un circuit permettant de prendre en charge cette nouvelle activité, tout en appréhendant et en contrôlant les risques. Ce circuit a été mis en place en attendant une salle de préparation spécifique aux médicaments de thérapie génique selon la recommandation 2 de la SFPO. Le but étant d'assurer la protection du personnel manipulant le produit, tout en garantissant la stérilité de la préparation du rAd-IFN et la sécurisation de notre circuit.

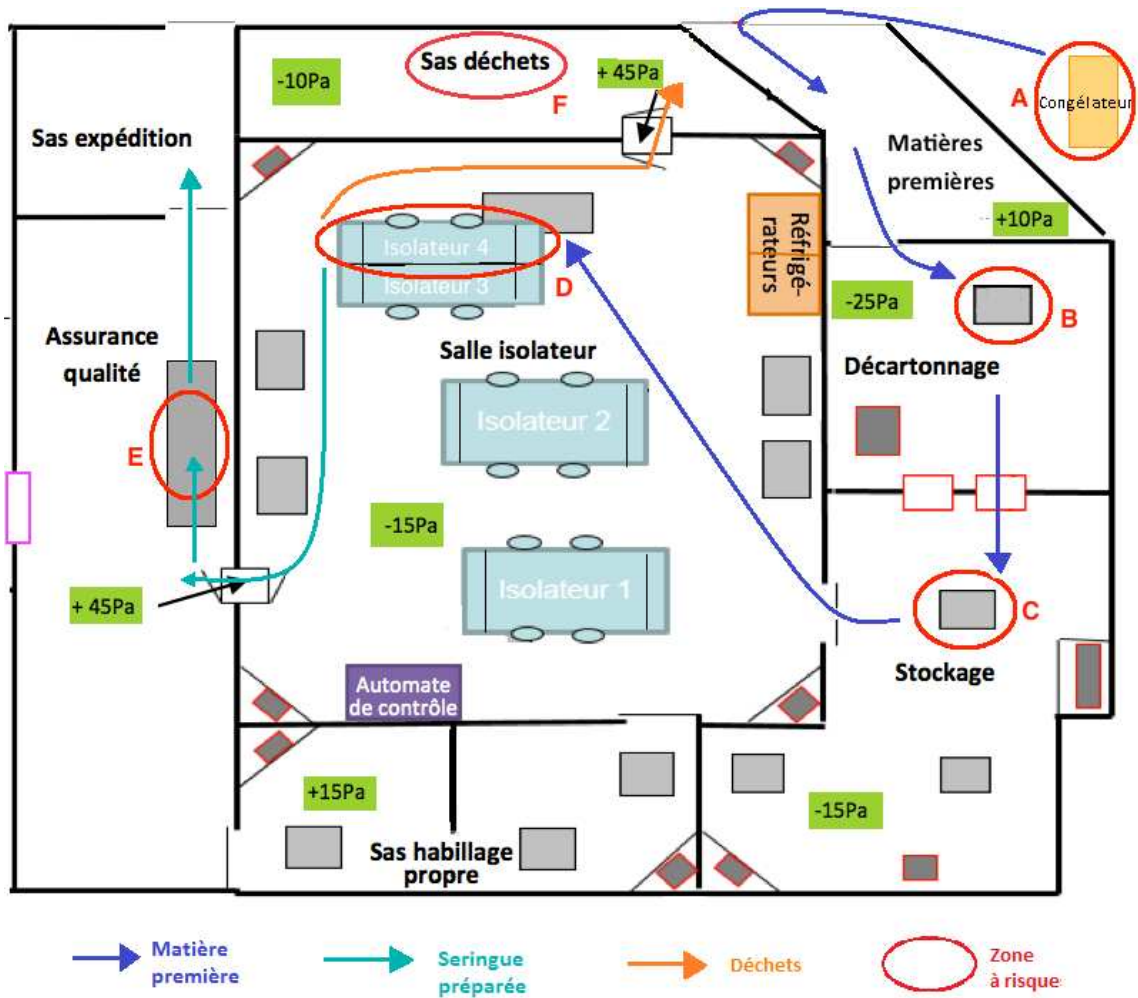


Figure 8: Circuit du produit rAd-IFN et zones à risques au sein de notre Zone à Atmosphère Contrôlée

- Le stockage du produit rAd-IFN a lieu dans les locaux des essais cliniques dans un congélateur dédié aux MTI permettant une congélation à -80°C.

Le transport du flacon est effectué à température ambiante dans un bac plastique jusqu'à la zone de décartonnage de l'UPCC par les personnes habilitées des essais

cliniques munies d'EPI avec masque chirurgical, surblouse à usage unique et double paire de gants en nitrile.

Tout au long du circuit, la personne manipulant le flacon ou la poche avec la double paire de gants ne doit toucher aucune autre surface afin d'éviter la contamination manuportée.

- Décontamination manuelle du flacon dans le local décartonnage: Avant leur entrée dans la zone à atmosphère contrôlée (ZAC) de l'UPCC, le flacon et le bac de transport sont décontaminés manuellement à l'aide de lingettes à usage unique, à la javel 5%, comme mentionné dans le protocole. Dans le local décartonnage de l'UPCC, le produit est manipulé avec une double paire de gants en nitrile et les EPI habituellement utilisés lors de la manipulation d'un flacon cytotoxique : un sarrau hydrophobe déperlant à manches longues et serré aux poignets, un masque chirurgical, une charlotte pour recouvrir les cheveux, des chaussures dédiées et/ou de surchaussures étanches. Les lingettes utilisées, les EPI et le carton d'emballage du flacon sont éliminés dans un DASRI spécifique OGM.
  
- Préparation du panier dans la salle de stockage. Celui-ci contiendra le flacon, un DASRI rigide portant la mention OGM, et le matériel nécessaire à la préparation :



- seringue de 50 mL et de 3mL BD Plastipak<sup>®</sup>,
- dispositif Phaseal<sup>®</sup> P14 pour le flacon,
- dispositif de transfert entre seringues : raccord femelle-femelle, connecteur C45 et injector,
- champs, gants, sachet stérile de suremballage,
- lingettes, désinfectant.



L'ensemble du panier est placé dans le sas d'entrée de l'isolateur et subit une décontamination au peroxyde d'hydrogène à 30% pendant 12 minutes.

- Un nettoyage de l'isolateur est réalisé entre deux préparations de nature différente comme le recommande la SFPO (recommandation 5). Il est réalisé avec des lingettes stériles et de l'Anioxy-spray avant la préparation et après avoir vidé l'ensemble du matériel pour éviter le risque de contamination croisée. L'Anioxy-spray respecte la norme virucide EN 14476+A1 et les règles de l'IPL Handlingbiosafety Guidance du 28 février 2018 recommandées dans le protocole de l'essai clinique. Il est composé de peroxyde d'hydrogène (50 mg/g soit 5%), d'éthanol (91.6 mg/g) et de tensioactif en milieu aqueux.
- En suivant les recommandations 13 et 14 de la SFPO, la mise en seringue complétée est réalisée à l'aide du système Phaseal<sup>®</sup>, un système clos qui permet de maîtriser le risque d'aérosolisation et limiter le risque de contamination de notre isolateur. La préparation est contrôlée visuellement par une seconde personne.

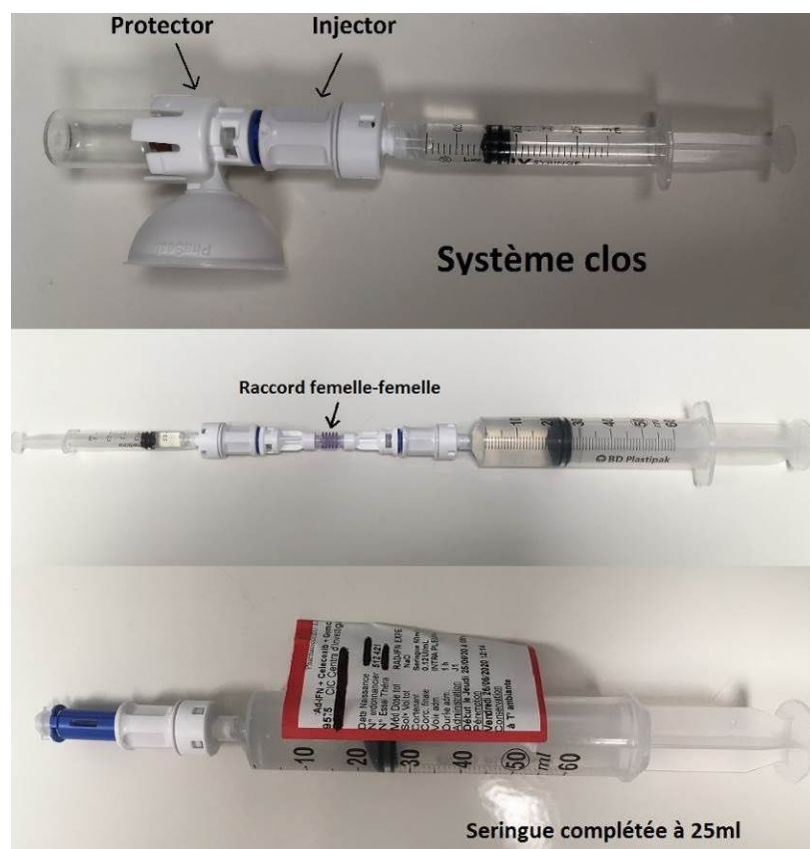


Figure 9 : Manipulation du rAd-IFN et mise en seringue complétée

- Lorsque la préparation est terminée, la seringue est conditionnée en sachet zippé et décontaminé avec l'Anioxy-spray avant sa sortie de l'isolateur.
- Le nettoyage des zones en contact avec le produit (sas d'entrée, de sortie, soudeuse et intérieur de l'isolateur) est effectué à l'aide d'Anioxy-spray. Une stérilisation de l'isolateur au peroxyde d'hydrogène est réalisée avant toute nouvelle préparation.
- Le sachet contenant la seringue est récupéré par une personne portant une double paire de gants. Il est soudé avant sa sortie de la ZAC vers la zone de libération des préparations.
- La libération de la préparation est effectuée par une personne portant une double paire de gant. La seringue est placée dans une boîte hermétique spécifique étiquetée « risque biologique » pour son transport jusqu'au service de soins.
- Tout au long du circuit, les déchets ayant pu être en contact avec le rAd-IFN sont placés dans un sachet DASRI portant la mention OGM (gants, EPI, lingettes). Ils sont collectés par un prestataire extérieur. Le DASRI rigide contenant le flacon vide et les déchets de préparation dans l'isolateur seront autoclavés pendant 20 minutes à 134°C avant élimination dans la filière DASRI. L'autoclavage n'est pas obligatoire pour un OGM de classe 1 selon les recommandations du HCB, mais recommandé par la SFPO et le promoteur de l'étude.
- Un kit bris de flacon contenant spécifiquement de l'eau de javel et les équipements de protection nécessaires est mis en place dans chaque zone à risque.

Ce circuit a été mis en place en se basant sur le peu de données disponibles à ce jour sur le risque de contamination virale des locaux de préparation des PUI. C'est pourquoi nous avons souhaité développer une méthode de détection du rAd-IFN afin de pouvoir s'assurer de la sécurité de notre circuit.

# **Partie II : Développement de la méthode de détection**

Pour cette partie, nous avons travaillé en collaboration avec l'unité de Microbiologie Clinique de l'Institut Pasteur de Lille (IPL) qui nous a apporté ses connaissances et son expérience en virologie, et nous a mis à disposition ses appareils analytiques.

Dans un premier temps, nous avons souhaité développer une méthode de détection adaptée à l'adénovirus présent dans notre médicament, si possible quantitative, grâce à une gamme standard de concentration d'adénovirus. Notre méthode de détection choisie sera alors testée avec différentes dilutions réalisées à partir de notre produit pur.

Dans un second temps, nous avons souhaité réaliser des prélèvements de surface dans nos locaux de préparation sur différents points critiques de notre circuit et avec différents dispositifs de prélèvements. Ces prélèvements seront analysés grâce à la méthode de détection définie précédemment.

## ***A) Choix des méthodes pour la détection du virus et pour les prélèvements de surface dans nos locaux***

### **1) Méthodes de détection de l'adénovirus**

#### **a) Choix de la technique de détection**

La première étape consiste à déterminer une méthode capable de détecter le rAd-IFN sur des surfaces inertes. Il existe plusieurs techniques utilisables pour la détection de virus :

- La microscopie électronique permet la visualisation des particules virales. Elle est utilisable pour la détection d'adénovirus sur des prélèvements de surface. Cependant, elle est peu utilisée au vu de l'investissement matériel et de la technicité élevée demandée.
- La culture cellulaire, auparavant considérée comme la technique standard pour les diagnostics virologiques, a été abandonnée à cause de ses nombreux inconvénients :

chronophage, savoir-faire nécessaire pour la manipulation des cellules humaines ou animales, nécessité d'équipements adaptés. La culture d'adénovirus est possible sur cellules épithéliales d'origine humaine (HeLa, Hep2, KB) ou sur fibroblastes embryonnaires (MRC-5). L'effet cytopathogène observé se développe en 3 à 7 jours. Cependant, cette technique ne peut pas être utilisée pour les virus non cultivables (40) car aucun effet cytopathogène ne sera observé : c'est le cas du virus étudié, étant donné qu'il est délété de ses fonctions répliquatives.

- La recherche du génome viral par PCR (Polymerase Chain Reaction). Il s'agit d'une technique moléculaire spécifique et sensible à un type de virus. Elle permet un diagnostic spécifique, rapide (en quelques heures) et est utilisable pour les virus non cultivables (41). Elle se réalise en 2 étapes : l'extraction, qui purifie l'ADN, puis la PCR quantitative ou (q-PCR) qui permet de quantifier l'ADN viral retrouvé dans l'échantillon analysé. Sa réalisation nécessite un Thermocycleur (automate de PCR) et des compétences spécifiques de manipulation.

- La recherche des antigènes viraux. C'est une technique immunologique qui permet de visualiser les antigènes par immunofluorescence ou technique ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux (AC) marqués et spécifiques de chaque virus. Cette technique est simple et rapide (une à deux heures) et serait utilisable grâce des AC spécifiques dirigés contre les hexons de la membrane de l'adénovirus. La fluorescence est ensuite observée. Cependant, cette méthodologie n'est pas adaptée à la recherche de contamination virale de l'environnement.

Dans notre cas, seule la technique de Q-PCR était envisageable pour détecter un virus non répliquatif. Par ailleurs, c'est une technique rapide, très sensible et très spécifique.

L'Institut Pasteur possède les appareillages et les compétences techniques pour réaliser les analyses.

## **b) Choix du kit de PCR**

Pour réaliser cette Q-PCR, nous avons besoin d'un kit de PCR qui réponde à notre cahier des charges :

- spécifique à l'adénovirus ;
- avec une gamme de quantification ;

- compatible avec le Thermocycler de l'institut Pasteur Quantstudio3<sup>®</sup> du laboratoire Thermo Fisher Scientifique ;
- si possible, contenant également un kit d'extraction manuelle ;
- avec un prix raisonnable.

Après recherche des fournisseurs et renseignement auprès de l'IPL concernant la compatibilité avec leur automate de PCR, nous avons contacté 3 laboratoires et reçu deux offres :

- Biomérieux<sup>®</sup> : Kit complet Adénovirus R-Gene Réf. 69-010: kit extraction + PCR 90 tests au prix de 1802 €.
- Altona diagnostic<sup>®</sup> : KitRealStar Adénovirus Réf. 301013, kit PCR uniquement, 96 tests au prix de 1 152 €.

Nous avons retenu le kit Adénovirus R-Gene de Biomerieux<sup>®</sup> car bien que plus cher, il complète tous les critères demandés et il a l'avantage de contenir un kit d'extraction prêt à l'emploi, dont le prix aurait dû être ajouté à la référence Altona diagnostic.

Cependant, après devis et commande auprès de Biomerieux, il s'est avéré que le kit d'extraction n'était plus disponible, seul le kit de PCR nous a été livré (1461€).

En substitution, nous avons choisi d'utiliser le kit d'extraction habituellement utilisé à l'IPL pour les extractions manuelles : Qiamp DNA minikit, 50 extractions, réf. 51304 de chez Qiagen<sup>®</sup> (164,9 €).

## **2) Méthodes de prélèvement surfacique dans nos locaux de préparation**

### **a) Choix du dispositif de prélèvement**

Afin de tester notre méthode de détection et savoir si nos locaux sont contaminés par l'adénovirus modifié après préparation, nous avons souhaité réaliser des prélèvements de surface. Cependant, en fonction du dispositif de prélèvement, de la solution de conservation utilisée et du type de surface à prélever, le pourcentage de virus récupéré sur le dispositif peut différer (42).

Nous avons sélectionné trois méthodes qui nous semblaient les plus efficaces :

- Dans un premier temps, nous avons voulu tester la méthode déjà réalisée en routine pour les prélèvements chimiques dans l'unité de préparation : il s'agit d'une méthode par essuyage à l'aide de compresses (43). Nous l'avons sélectionnée car c'est la plus fréquemment inventoriée parmi les différentes méthodes de prélèvement de contamination chimique de surface recensées et analysées par *Petit et al.* en 2017 (44).

Cela nous permettrait d'effectuer les prélèvements avec le matériel déjà référencé et disponible à la pharmacie. De plus, le mode opératoire est déjà connu par l'équipe.

- Les 2 autres méthodes ont été choisies d'après une publication de *Julian et al. de 2011* (45). Elle regroupe une revue de la littérature concernant les résultats de 59 études de prélèvements surfaciques viraux et une analyse expérimentale sur le pourcentage de virus retrouvé, en fonction :

- de trois dispositifs de prélèvement (écouvillon en coton, écouvillon en polyester floqué et tissu antistatique),
- avec trois types d'agent mouillant (solution saline 0,85%, ringer ¼ et milieu de transport viraux),
- sur 2 types de surface : polychlorure de vinyle (PVC) et acier inoxydable.

Dans cette étude, les écouvillons en polyester floqué semblent être les plus efficaces et retrouvent jusqu'à 40% des particules virales. Les écouvillons en coton retrouvent jusqu'à 38% et le tissu antistatique ne retrouve quant à lui que 9% des particules virales. L'intérêt du flochage est la capture des particules virales uniquement en surface sans rétention dans la masse de l'écouvillon, ce qui permet une élution et un relargage plus important dans l'agent mouillant. Dans l'étude, le type d'agent mouillant et la surface n'ont pas influencé de manière significative la fraction de virus retrouvée.

Ainsi, nous avons choisi de réaliser nos prélèvements également avec des écouvillons en polyester floqué et en coton. Nous avons donc recherché les références correspondantes qui répondaient au cahier des charges suivant :

- emballage unitaire ;
- stérile ;

- tige sécable ou cassable facilement, pour être insérée dans un tube de centrifugation de 15mL ;
- écouvillon sec, non pré-humidifié afin de pouvoir utiliser le même agent mouillant.

Nous avons ainsi retenu 2 écouvillons disponibles au CHU correspondant à ces critères : écouvillons secs stériles en coton et bois Deltalab réf. 300250 et écouvillons stériles en Polyester floqués Puritan Medical Products réf. 25-3317-U (disponible avec un milieu de transport viral Thermo Fisher réf. R12566).

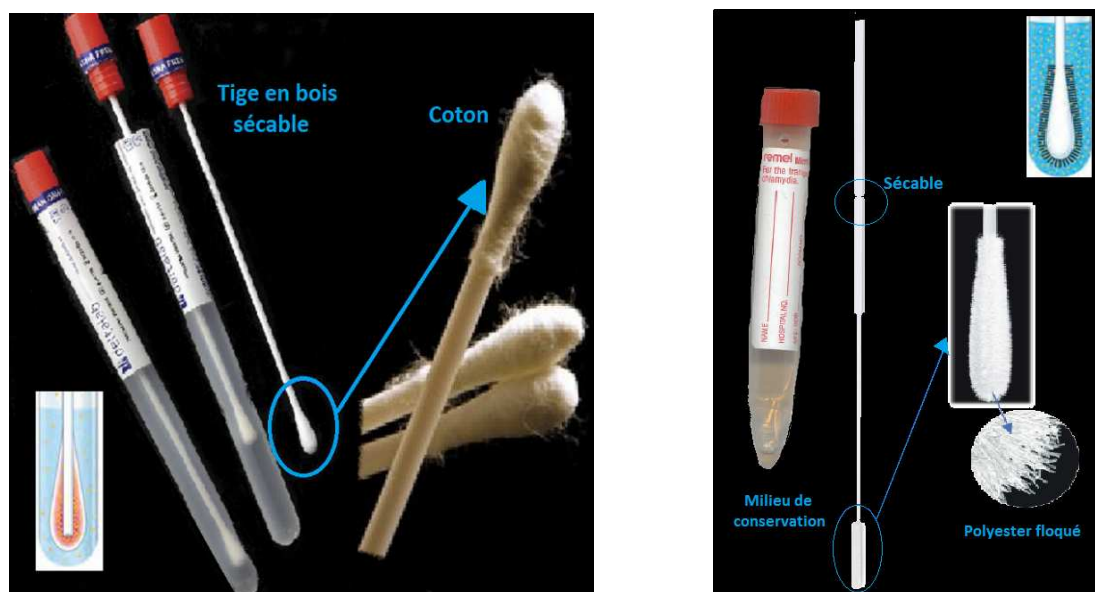


Figure 10 : Ecouvillon en coton sec et écouvillon en polyester avec milieu de transport

### b) Choix du milieu de conservation

La plupart des écouvillons sont fournis avec un milieu de transport viral. Cependant, le tampon phosphate salin (PBS) est également une solution efficace pour le transport et la conservation des virus, comme le prouve une étude récente comparant l'efficacité d'un milieu de transport viral avec le PBS pour la conservation du coronavirus (42). Ainsi, pour ne pas avoir de biais entre les différents dispositifs de prélèvements, leurs contenants et leurs milieux de transport, le PBS sera utilisé comme agent mouillant pour tous les prélèvements, et ceux-ci seront tous conservés dans des tubes de centrifugation Falcon de 15 mL contenant du PBS.

### **c) Mode de conservation**

Les tubes Falcon de 15 mL, dans lesquels les échantillons sont conservés, sont complétés au préalable avec 2mL de PBS pour les écouvillons coton et polyester et 3,5mL pour les compresses. Ces deux volumes sont les volumes minimaux pour que le dispositif de prélèvement soit totalement immergé afin d'éviter la dessiccation du virus. Les compresses de 5x5cm seront d'ailleurs coupées en deux dans l'isolateur avant prélèvement afin que 3.5mL suffisent à leur immersion complète. En effet, l'humidité est un caractère important pour la conservation des vecteurs viraux (46).

Pour éviter la dégradation du virus et permettre une conservation de plusieurs semaines, ceux-ci seront congelés à -80°C (47).

Les 3 méthodes de prélèvement seront comparées pour garder la plus efficiente dans notre cas.

## ***B) Mode opératoire***

### **1) Dilutions du produit pur**

Dans un premier temps, pour tester la méthode de détection par qPCR, nous avons effectué des dilutions à partir du produit pur grâce à un reliquat de flacon de rAd-IFN.

Concernant la gestion des risques, les mêmes principes de précaution sont utilisés que lors d'une manipulation en condition réelle comme détaillé dans la partie I.

Etant donné que notre flacon contient  $3.10^{11}$  particules virales dans un millilitre, nous avons réalisé des dilutions afin d'atteindre des concentrations similaires à celle de la gamme standard d'adénovirus fournie par le kit de PCR, ces dernières allant de  $3.10^3$  à 3 particules virales/ $\mu$ L. La gamme de dilution de notre produit pur sera réalisée au dixième de  $3.10^7$  à 3 particules virales/ $\mu$ L. Ainsi, les dilutions les plus faibles permettront de se comparer à la gamme standard du kit de PCR.

Dans l'isolateur, 8 cryotubes sont préparés et numérotés de  $3.10^7$  à 3 particules virales/ $\mu$ L. 900  $\mu$ L de PBS sont disposés dans chaque cryotube à l'aide d'une micropipette de 1000  $\mu$ L.

100 $\mu$ L du flacon de rAd-IFN (solution pure à  $3.10^8$  particules/ $\mu$ L) sont prélevés à l'aide d'une micropipette 100  $\mu$ L et ajoutés dans le premier cryotube nommé «  $3.10^7$  particules/ $\mu$ L ».



Après homogénéisation à l'aide de la micropipette, 100  $\mu\text{L}$  de la solution du tube «  $3 \cdot 10^7$  particules/ $\mu\text{L}$  » sont prélevés et ajoutés dans le deuxième cryotube «  $3 \cdot 10^6$  particules/ $\mu\text{L}$  ». L'opération se répète jusqu'au dernier cryotube de « 3 particules/ $\mu\text{L}$  ».

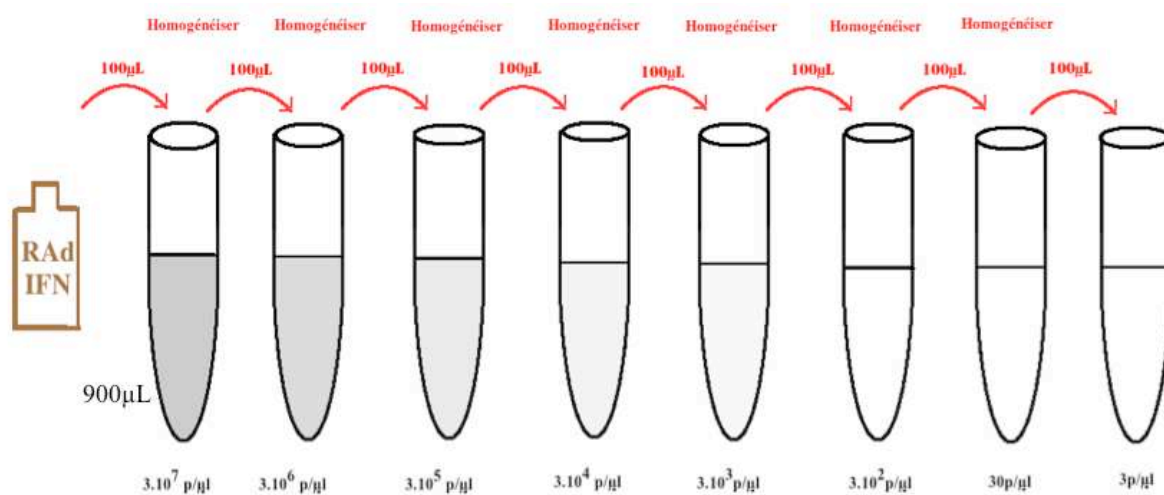


Figure 11: Dilutions du rAd-IFN réalisées au 10ème



Figure 12 : Préparation des dilutions du rAd-IFN dans l'isolateur de l'UPCC

L'ensemble des tubes est disposé dans un sachet stérile dont l'extérieur est décontaminé à l'Anioxspray puis sorti de l'isolateur et conservé à -80°C jusqu'à analyse. L'isolateur a été décontaminé et stérilisé après ces manipulations.

## **2) Prélèvements surfaciques dans nos locaux de préparation**

### **a) Mode de prélèvement**

Pour chaque point de prélèvement, les 3 dispositifs de prélèvement ont été utilisés. Le matériel nécessaire est :

- 3 sachets de 5 compresses stériles non tissées 5x5 cm coupées en deux (réf. 22104KL2, Tétra Medical) et 10 pinces stériles Kocher,
- 10 écouvillons en coton stériles Deltalab réf. 300250,
- 10 écouvillons en Polyester floqué stériles Puritan Medical Products réf. 25-3317-U.

La norme NF EN ISO 14698-1 de 2004 « *Maîtrise de la biocontamination* » (48) recommande d'humidifier l'écouvillon avant prélèvement à l'aide d'un diluant car cette étape améliore le relargage des microorganismes (49). Ainsi, chaque dispositif de prélèvement est pré-humidifié avec 0,1mL de PBS juste avant prélèvement pour récupérer le maximum de particules virales.

Elle préconise également d'effectuer le prélèvement avec l'écouvillon en réalisant des stries parallèles rapprochées sur la surface à prélever, puis des stries perpendiculaires, en faisant tourner légèrement l'écouvillon, avec un angle de 45° et une pression constante, sur une surface entre 20 à 100cm<sup>2</sup>. Nous avons choisi de prélever sur une surface de 100cm<sup>2</sup> comme pour les prélèvements chimiques.

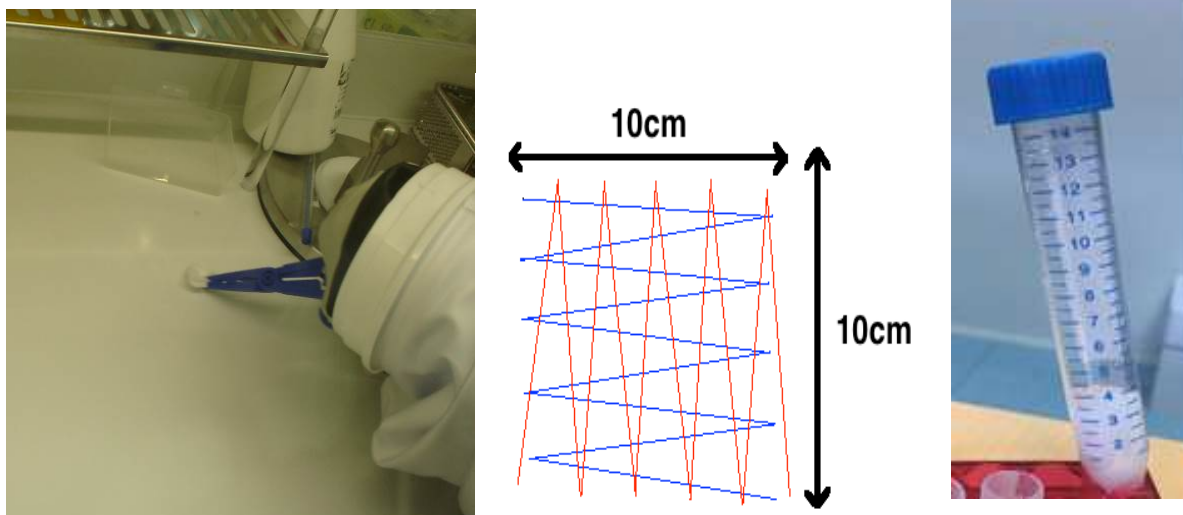


Figure 13 : Mode de prélèvement pour la réalisation des prélèvements surfaciques et mode de conservation

### b) Plan de prélèvements viraux surfaciques

Les prélèvements ont été effectués après une manipulation en condition réelle pour un patient.

En fonction des étapes critiques du circuit, un plan de prélèvement a été conçu pour les différentes zones de l'UPCC (Figure 14, Annexe 1) :

- En zone décartonnage (zone B), après décongélation, un prélèvement est réalisé sur l'extérieur du flacon de rAd-IFN (*P1*) et sur son bac de transport plastique avant décontamination à la javel 5% (*P2*).
- Dans l'isolateur (zone D) après la préparation, les prélèvements ont eu lieu : sur l'extérieur du flacon (*P3*), sur le conditionnement final de la préparation (seringue) (*P4*), sur la surface du sachet de la préparation avant décontamination à l'Anioxy-spray (*P8*), sur les gants stériles dans l'isolateur (*P5*), le plan de travail (*P6*) et la vitre de l'isolateur (*P7*).
- En assurance qualité (zone E) avec un prélèvement de la surface du sachet contenant la préparation (*P9*).

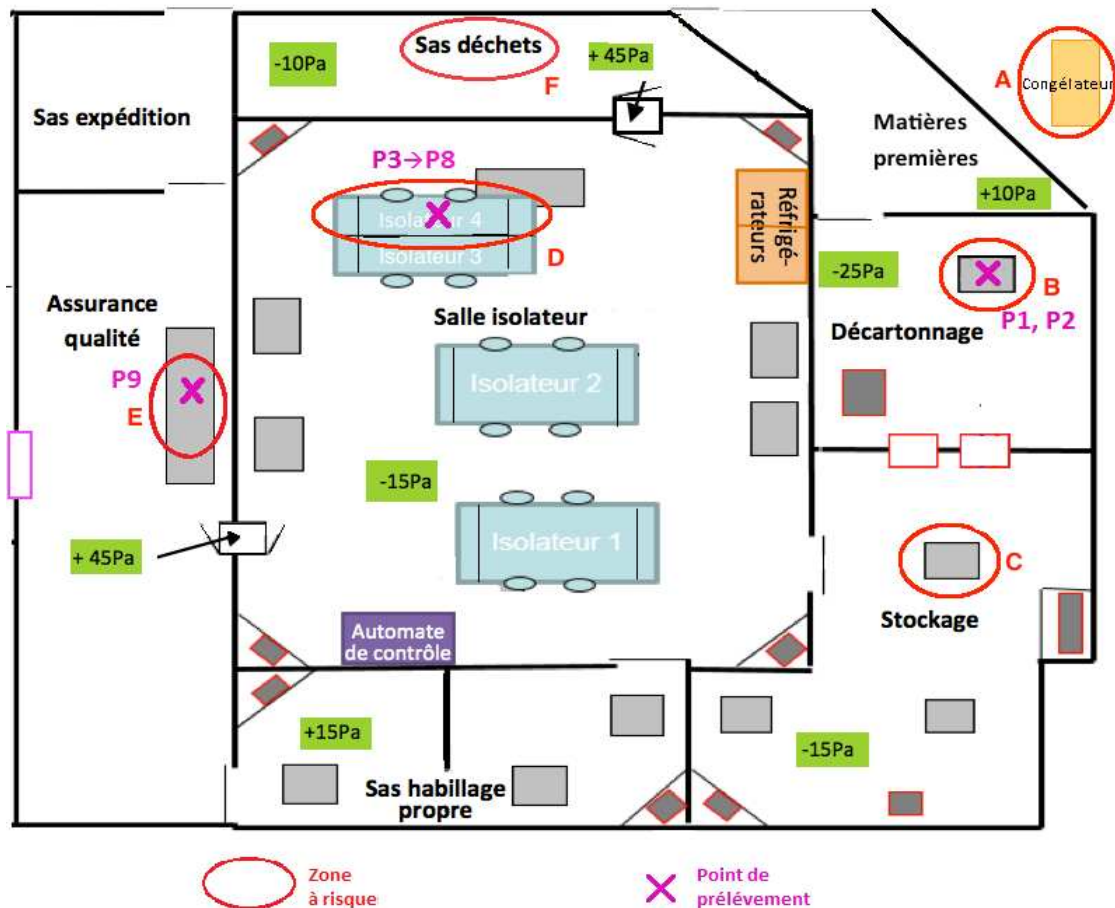


Figure 14 : Plan de prélèvement virologique au sein de l'UPCC de Lille

Les échantillons sont conservés au congélateur  $-80^{\circ}\text{C}$ , à la verticale, pour que la compresse ou l'écouvillon soit toujours immergé dans le PBS.

### c) Test positif, test négatif et test provoqué

Un test positif a été effectué dans l'isolateur en déposant  $100\ \mu\text{L}$  de reliquat de la solution pure de rAd-IFN directement sur chaque dispositif de prélèvement sans humidification préalable.

Un test négatif a été réalisé dans l'isolateur en introduisant directement le dispositif de prélèvement dans le tube Falcon sans humidification préalable et avant la réalisation de la préparation pour éviter tout contact avec le rAd-IFN.

Un test de contamination provoquée est réalisé en déposant  $20\ \mu\text{L}$  de reliquat de la solution pure (correspondant à une grosse goutte) de rAd-IFN à trois points différents sur le plan de travail de l'isolateur. Après 5 minutes, mimant le temps d'une préparation, chaque point est prélevé à l'aide d'un des 3 dispositifs préalablement humidifié avec  $100\ \mu\text{L}$  de PBS, en

partant du point de dépôt de la goutte sur  $100\text{cm}^2$ , de la même manière que pour les précédents prélèvements.

Les tests positifs, négatifs et provoqués ont été réalisés pour les 3 types de dispositifs et ont été conservés dans du PBS à  $-80^\circ\text{C}$  en attendant leur analyse.

### **3) Analyse des dilutions et prélèvements surfaciques**

#### **a) Extraction**

Le but de l'extraction est d'éliminer tous les contaminants que nous pourrions retrouver dans nos dilutions ou prélèvements pour obtenir un éluat pur, contenant uniquement l'ADN viral recherché. L'extraction utilise les propriétés des colonnes de silice qui fixent sélectivement l'ADN.

L'extraction se déroule en 4 étapes :

- la lyse de l'échantillon ;
- le transfert du produit à extraire dans les colonnes de silice où l'ADN viral restera fixé ;
- le rinçage de la colonne de silice : la colonne est rincée à l'aide de réactifs qui permettent de se débarrasser des constituants non souhaités et de conserver uniquement l'ADN viral resté fixé sur les parois de la colonne ;
- l'élution : on utilise une solution qui va inverser les relations d'affinité de la colonne pour l'ADN et permet de le « décrocher » des parois de silice. Le liquide récupéré est nommé « éluat ».

Pour la réalisation de l'extraction, après décongélation, nous avons tout d'abord prélevé  $200\mu\text{L}$  de chaque dilution auquel nous avons ajouté  $200\mu\text{L}$  de tampon de lyse (buffer AL) et  $20\mu\text{L}$  de protéase dans un micro tube.

Concernant les prélèvements, nous avons centrifugé les tubes Falcon contenant les échantillons à une vitesse de 7500 rpm (rotation per minute) pendant 30 minutes pour permettre un relargage optimal des particules virales. Le surnagent a été éliminé pour obtenir un culot de  $400\mu\text{L}$  pour tous les échantillons. La lyse a eu lieu directement dans les tubes Falcon contenant encore les dispositifs de prélèvement en ajoutant  $400\mu\text{L}$  de tampon de lyse et  $40\mu\text{L}$  de protéase.

Puis, les dilutions et prélèvements sont vortexés brièvement, incubés à 56°C pendant 20 minutes puis centrifugés une dizaine de seconde pour faire tomber l'ensemble du liquide dans le fond des tubes.

Ensuite, 200µL d'éthanol sont ajoutés aux dilutions et 400 µL aux prélèvements. L'ensemble des tubes est à nouveau vortexé brièvement. Chaque mélange obtenu est transféré dans une colonne de silice identifiée. Les colonnes sont centrifugées à 8000 rpm pendant 1 min.

L'ADN reste fixé sur la silice, alors que le reste de l'échantillon tombe dans le tube de récupération. Les colonnes de silice sont ensuite rincées avec 500 µL d'un premier tampon AW1, centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute. Les tubes de récupérations sont vidés et les colonnes sont rincées une seconde fois avec 500 µL d'un deuxième tampon AW2, puis centrifugées à 14000 rpm pendant 2 minutes. Après que les tubes de récupération soient à nouveau vidés, une nouvelle centrifugation (1min à 14000 rpm) est effectuée pour s'assurer d'éliminer toute trace de tampon AW2.

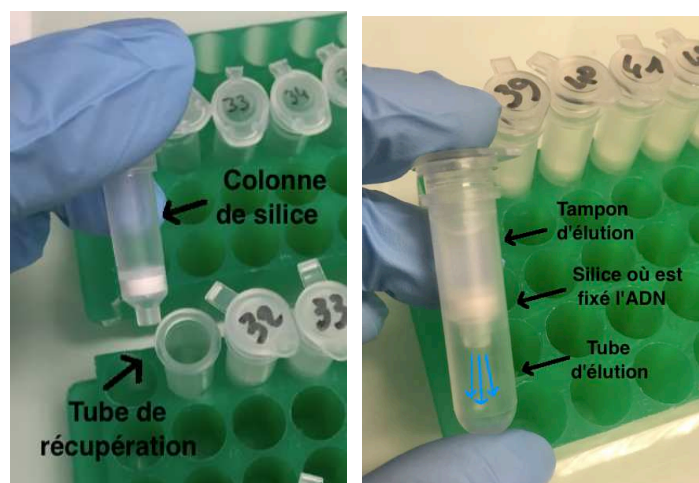
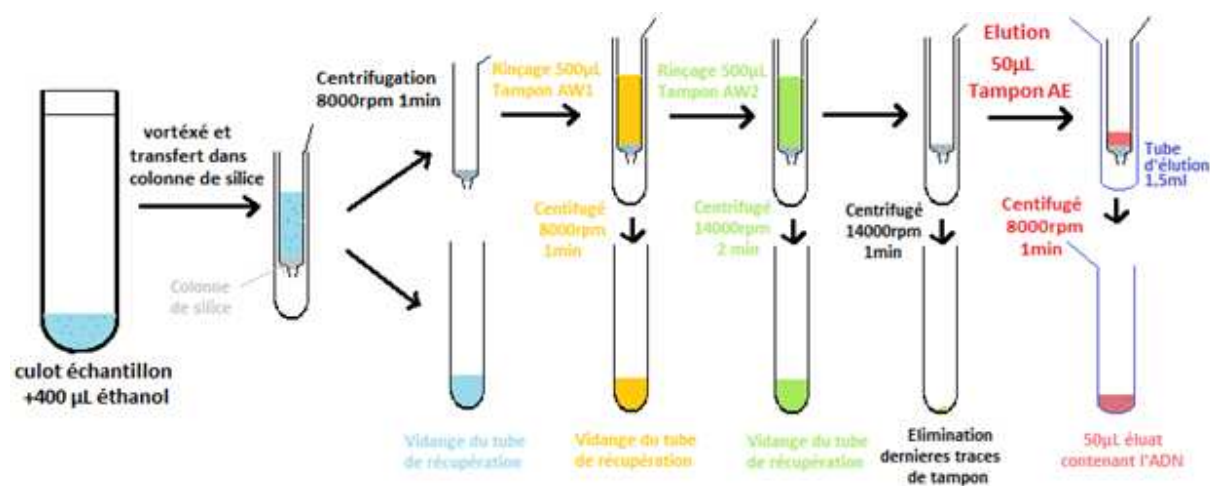


Figure 15 : Les différentes étapes d'extraction et photo des colonnes de silice

Ensuite, la colonne de silice est placée dans un nouveau tube d'éluion de 1,5 mL. 50µL de tampon d'éluion (Buffer AE) sont ajoutés à la colonne de silice, puis centrifugés à 8000 rpm pendant 1 minute. Cet éluat obtenu contient l'ADN de l'adénovirus (si présence dans l'échantillon) et sera directement utilisable pour son amplification par qPCR. Il peut être conservé un an entre -18 et -22°C.

Ces différentes étapes ont été réalisées en suivant le mode opératoire recommandé dans notre kit d'extraction Qiagen (Annexe 2).

### b) qPCR

Le but de la qPCR est d'amplifier un fragment de l'ADN du gène pour permettre une détection qualitative et quantitative de l'adénovirus. Elle se déroule en 3 phases :

- la dénaturation qui permet de séparer les deux brins d'ADN en élevant la température ;
- l'hybridation où les 2 amorces spécifiques à l'adénovirus vont venir se fixer au brin d'ADN. Les amorces sont de courtes séquences d'oligonucléotides composés de 10 à 15 paires de bases complémentaires à une partie spécifique de notre ADN viral et vont servir de point de départ à la synthèse du brin correspondant.
- et enfin l'élongation, étape durant laquelle l'ADN polymérase va synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à partir de l'amorce.

La répétition de ces trois phases va permettre une augmentation de la concentration du fragment d'ADN recherché lors de la PCR.

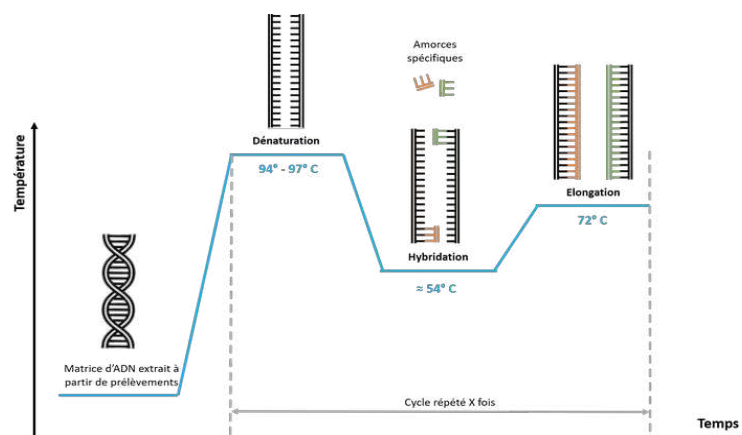


Figure 16 : Etapes du cycle d'une PCR en fonction de la température et du temps

La taille du fragment de l'adénovirus amplifié est de 138bp, il est localisé dans l'hexon codant pour les capsomères hexagonaux formants les sous unités de la capside protéique des adénovirus.

Dans le kit Biomerieux utilisé, nous avons à disposition :

- 1 contrôle de sensibilité «SC» à 1 particule/ $\mu$ L,
- 1 contrôle interne «IC» pour valider l'analyse,
- 4 standards internes permettant de créer une gamme de concentration de 3 à 3000 particules/ $\mu$ L et quantifier la charge virale,
- un prémix contenant les amorces d'amplification et les nucléotides nécessaires aux phases d'hybridation et d'élongation pour la réalisation de la PCR.

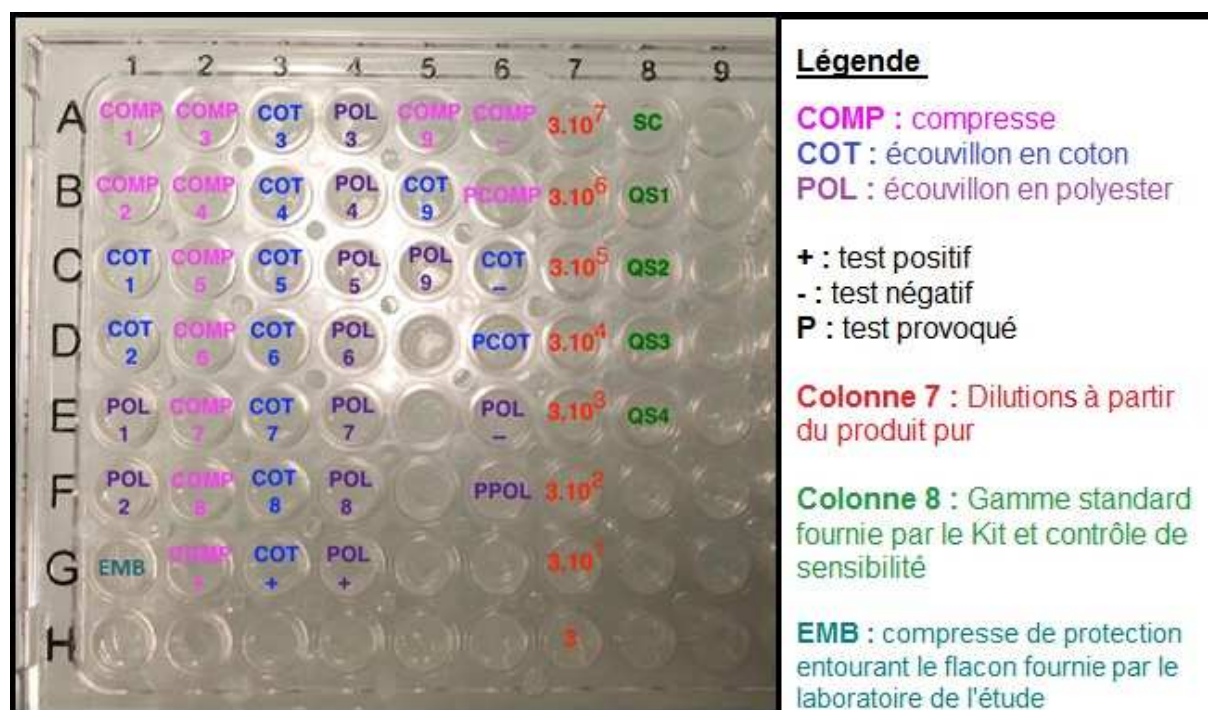


Figure 17 : Plan de répartition des échantillons dans les puits de la plaque de PCR

Pour chaque puits de la plaque de PCR utilisé, 15 $\mu$ L de prémix d'amplification R10 sont déposés selon le mode opératoire du kit (Annexe 3). Puis 10 $\mu$ L de chaque extraction de nos prélèvements ou des contrôles standards du kit sont déposés selon les puits identifiés. Un film transparent est ensuite collé sur la plaque pour isoler les puits et éviter l'évaporation des échantillons. La plaque est centrifugée pour que l'ensemble du mélange tombe au fond des puits.



Le thermocycleur utilisé est le Quantstudio3<sup>®</sup> du laboratoire Thermo Fisher Scientifique. Une phase d'activation de la Taq polymérase a été effectuée à 95°C pendant 15 min, puis 45 cycles ont été programmés avec une phase de dénaturation de 10 secondes à 95°C et une phase d'hybridation et d'élongation de 40 secondes à 60°C, soit une durée totale d'une heure et trente minutes.

## C) Résultats

### 1) Interprétation de la qPCR

Lors d'une PCR quantitative, c'est la gamme standard qui va nous permettre de quantifier l'ADN contenu dans l'échantillon.

La valeur Ct « Threshold Cycle » ou « cycle seuil » correspond au premier cycle à partir duquel le produit devient détectable et quantifiable grâce au fluorochrome. L'émission de fluorescence reflète la quantité d'ADN à chaque cycle. Plus la quantité d'ADN initiale est élevée, plus la valeur de Ct est faible, car il faut moins de cycles de PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente.

### 2) Gamme des standards externes d'adénovirus

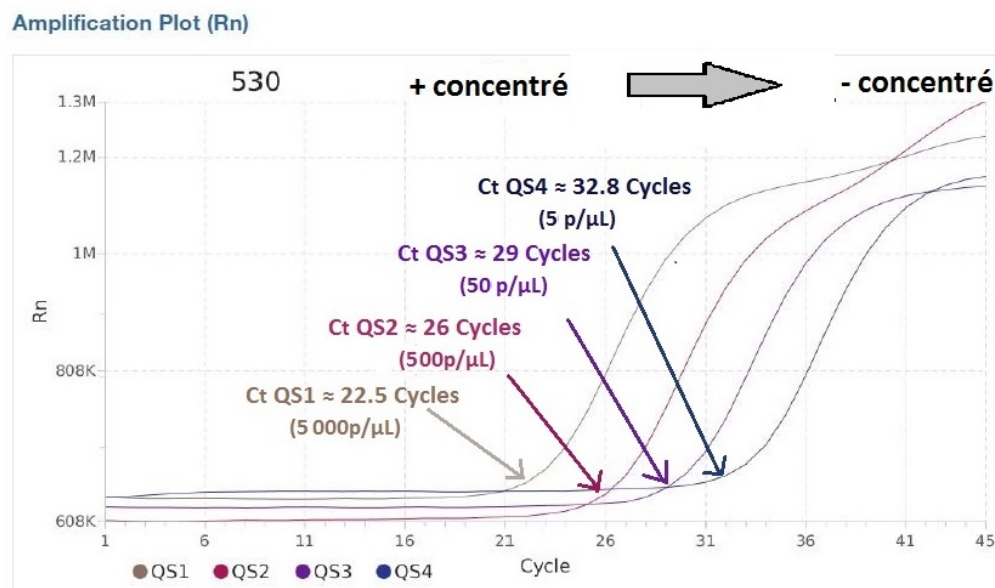


Figure 18: Analyse de la gamme standard externe du kit par qPCR

La figure 18 représente l'apparition exponentielle de la fluorescence (Rn) en fonction du nombre de cycle pour chacun des 4 points de la gamme standard (QS1 à QS4). Le Ct est déterminé par le début de la phase exponentielle de la courbe d'amplification.

## Standard Curve

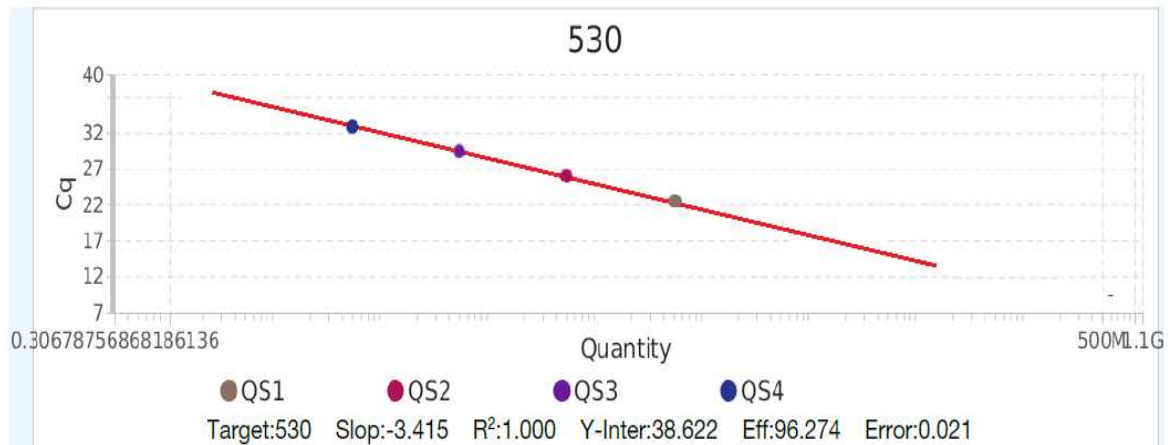


Figure 19: Analyse de la courbe standard

La gamme standard, dont les concentrations sont connues, nous permet d'établir une courbe standard avec une correspondance entre le Ct et la concentration en adénovirus :

$$Ct=f(\text{Log concentration en adénovirus}).$$

La gamme standard est validée selon le protocole du kit (figure 19, annexe 3) : la pente est de -3.14 (doit être comprise entre -3.917 et -3.103), le coefficient de corrélation  $R^2$  est de 1 (il doit être supérieur à 0,985) et l'efficacité est de 96.2% (elle doit être comprise entre 90 à 110%).

### 3) Analyse des échantillons par qPCR

#### a) Conditions de validation

Pour valider l'analyse par PCR, il est nécessaire de respecter 3 conditions définies par le protocole du kit avec notre Thermocycleur (Annexe 3):

- le contrôle IC+WO doit être uniquement visible à 560 nm (fluorochrome différent de celui pour l'analyse à 530nm), et détectable avant le 32ème cycle de PCR
- le signal de QS3 doit apparaître entre le 29 et le 33<sup>ème</sup> cycle de PCR
- la gamme standard doit être validée.

Dans notre cas, un seul paramètre n'est pas respecté : le signal du contrôle IC+WO apparaît également à 360nm. Cela signifie qu'il y a eu une contamination par de l'ADN viral, soit lors de la réalisation de l'extraction, soit lors de l'ajout du prémix lors de la réalisation de la

PCR. Ce signal de contamination étant visible à partir du 35<sup>ème</sup> cycle, tous les échantillons dont le signal est supérieur à 35 cycles sont non interprétables (NI). En effet, dans ce cas, il est impossible de savoir si le signal provient de cette contamination ou réellement de l'échantillon en lui-même. De plus, de manière générale pour une PCR quantitative, un Ct supérieur à 35/37 cycles est généralement considéré comme douteux.

### b) Analyse des résultats pour les dilutions de rAd-IFN

Pour valider la méthode de détection, nous avons utilisé une gamme de dilution réalisée à partir du produit pur pour être certain que notre méthode détecte notre adénovirus modifié.

D'après les courbes obtenues ci-dessous, le rAd-IFN est bien reconnu par la méthode et est correctement amplifié, la dilution au 10<sup>ème</sup> semble régulière.

Le graphique représente l'apparition de la fluorescence (Rn) liée à la concentration d'ADN en ordonnée en fonction du nombre de cycles.

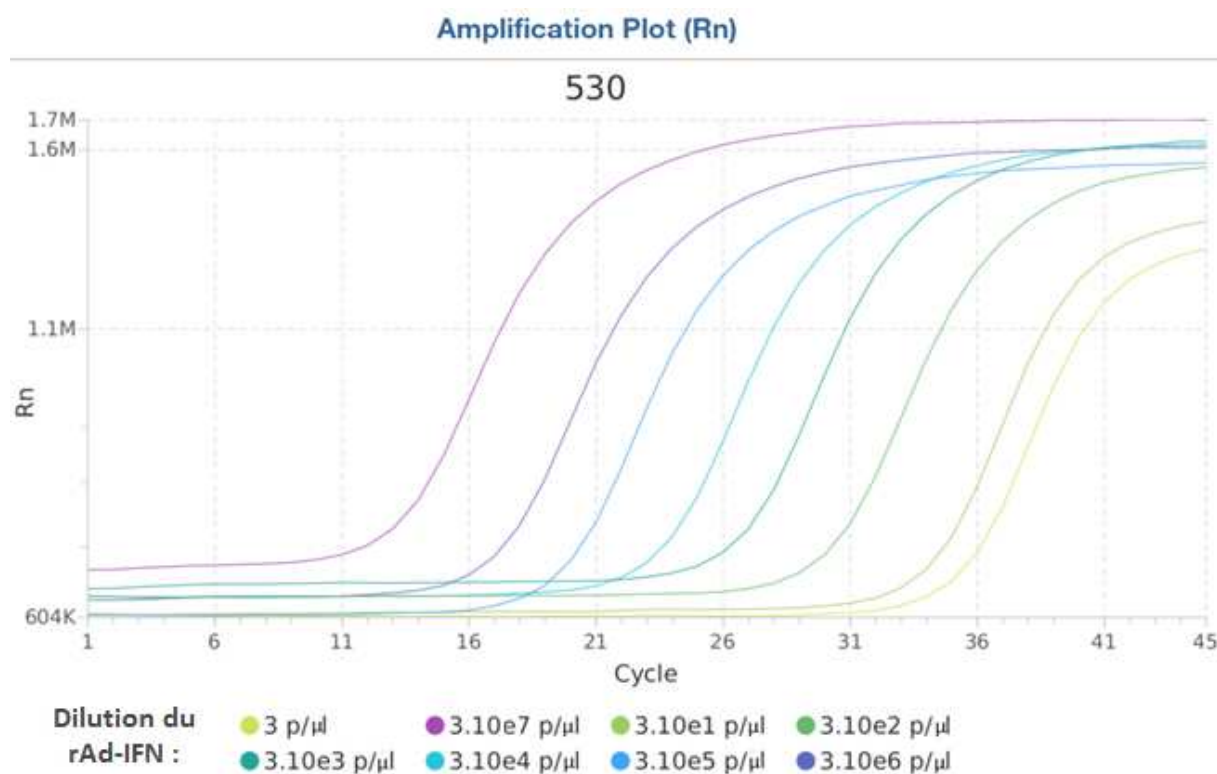


Figure 20 : Analyse des dilutions au 10<sup>ème</sup> à partir du produit pur par qPCR

A partir de la courbe standard et du Ct obtenu pour chaque dilution, nous en avons déduit le nombre de particules en rAd-IFN contenu dans les 10μL d'extraction.

Ce nombre de particules est multiplié par 5 pour ramener au volume total extrait de 50  $\mu\text{L}$  et divisé par 200 pour l'exprimer en concentration (pour rappel, nous avons utilisé au départ 200 $\mu\text{L}$  de dilution pour réaliser l'extraction).

Concentration théorique de la dilution (particules/ $\mu\text{L}$ )	Ct (cycles)	Nombre de particules dans 10 $\mu\text{L}$ extrait	Nombre de particules dans volume total extrait	Concentration obtenue par la PCR (particules/ $\mu\text{L}$ )	Différence entre la concentration théorique de la dilution et celle analysée par la PCR
$3 \cdot 10^7$	12.4	$4,8 \cdot 10^7$	$24 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	-1,39 log
$3 \cdot 10^6$	16	$4,2 \cdot 10^6$	$21 \cdot 10^6$	$1,05 \cdot 10^5$	-1,46 log
$3 \cdot 10^5$	18.6	$7,5 \cdot 10^5$	$37,5 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^4$	-1,2 log
$3 \cdot 10^4$	22.4	$5,5 \cdot 10^4$	$27,5 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$	-1,33 log
$3 \cdot 10^3$	25.6	$6,5 \cdot 10^3$	$32,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^2$	-1,24 log
$3 \cdot 10^2$	29	$6,3 \cdot 10^2$	$31,5 \cdot 10^2$	15,7	-1,28 log
$3 \cdot 10^1$	33.1	$4,0 \cdot 10^1$	200	1	-1,52 log
3	34.3	19	95	0.47	-0.8 log

TABLEAU 3 : Résultats de la gamme de dilution par qPCR

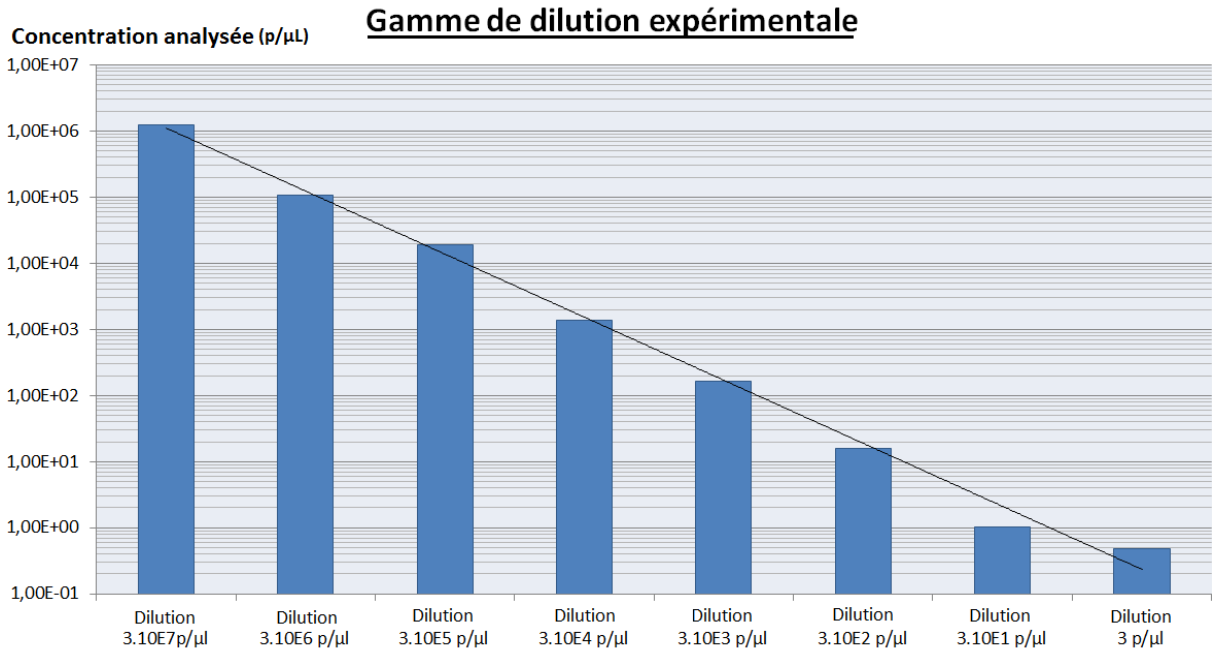


Figure 21 : Concentration d'ADN viral analysée en fonction de la gamme de dilution

**c) Analyse des résultats pour les tests positifs, négatifs et provoqués**

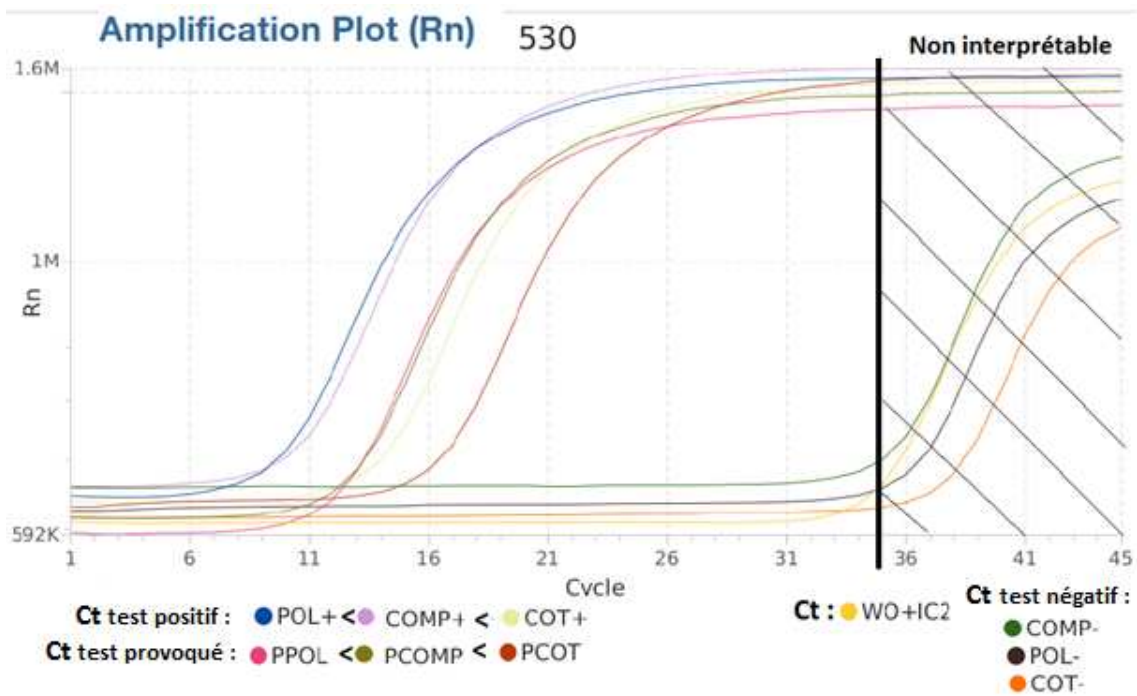


Figure 22 : Analyse des tests positifs, négatifs et provoqués par qPCR en fonction du dispositif de prélèvement

Comme démontré sur le graphique, toutes les courbes ayant des Ct supérieur à 35 cycles (Ct du contrôle IC+WO) ne sont pas interprétables, car ces échantillons sont possiblement contaminés lors de l'extraction/PCR. Ainsi les 3 témoins positifs ne sont pas interprétables.

Pour les tests positifs :

La quantité initiale de particules déposées sur le prélèvement était de  $3.10^{10}$  particules virales (100µl de produit pur à  $3.10^8$ p/µL).

Test	Ct (cycles)	Nombre de particules théorique dans 10µL extrait	Nombre de particules théorique dans volume total extrait	Différence entre le nombre de particules théorique et celui analysé par la PCR
POL +	8,6	$6. 10^8$	$3,06. 10^9$	-0,99 log
COMP +	9,4	$3,6. 10^8$	$1,83. 10^9$	-1,21 log
COT+	12,9	$3,4. 10^7$	$1,7. 10^8$	-2.24 log

TABLEAU 4 : Nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les tests positifs en fonction du dispositif de prélèvement

Pour les tests de contamination provoquée:

La quantité initiale de particules déposée sur le plan de travail de l'isolateur était de  $6.10^9$  particules virales (20µl de produit pur à  $3.10^8$ p/µL).

Test	Ct (cycles)	Nombre de particules théorique dans 10µL extrait	Nombre de particules théorique dans volume total extrait	Différence entre le nombre de particules théorique et celui analysé par la PCR
PPOL	11,5	$9.3.10^7$	$4,66.10^8$	-1,11 log
PCOMP	11.7	$7,6. 10^7$	$3,82.10^8$	-1,20 log
PCOT	15,6	$5,75. 10^6$	$2,88.10^7$	-2.31 log

TABLEAU 5 : Nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les tests provoqués en fonction du dispositif de prélèvement

#### d) Analyse des résultats pour les prélèvements superficiels

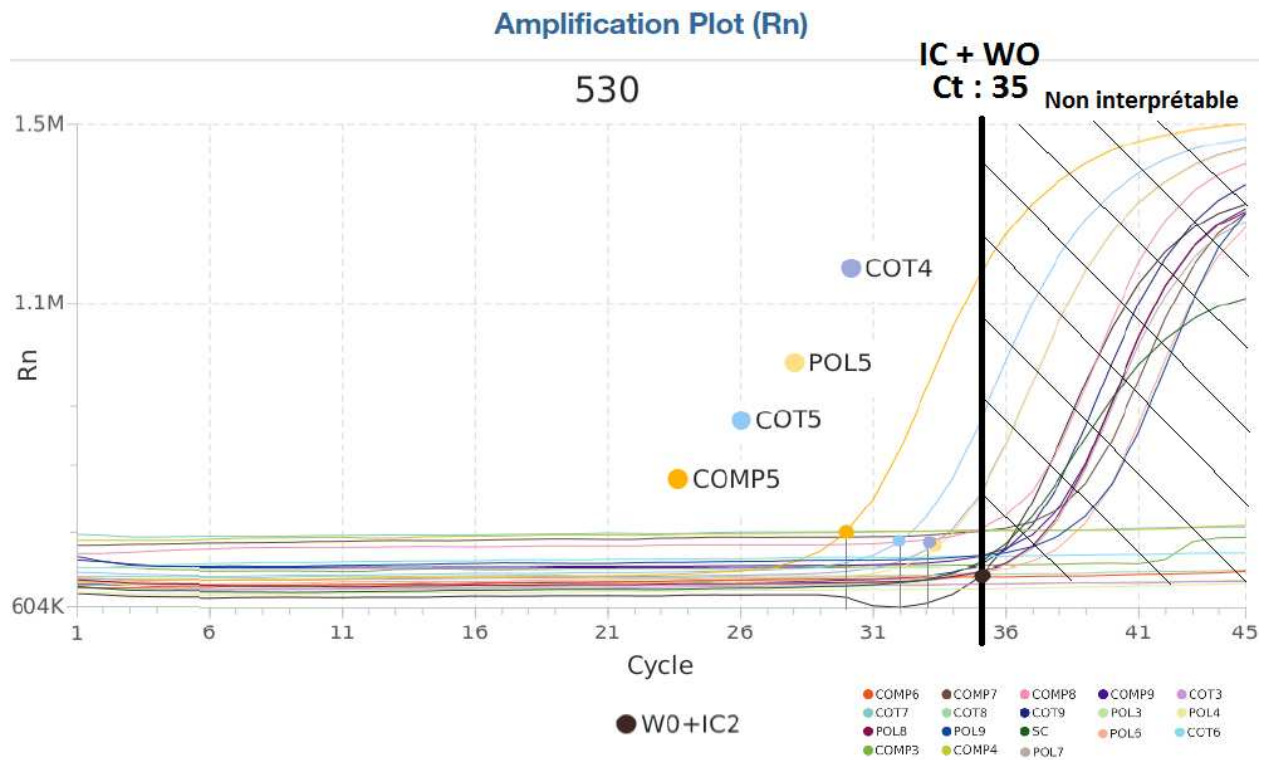


Figure 23 : Analyse des prélèvements superficiels par qPCR

Nous avons établi un tableau reprenant, pour chaque point de prélèvement, la détection d'adénovirus en fonction des 3 dispositifs de prélèvements utilisés, avec 3 conclusions possibles :

- Présence d'ADN d'adénovirus, soit un Ct de détectabilité avant le 35ème cycle
- Absence d'ADN d'adénovirus: aucune courbe n'apparaît sur le graphique de la PCR de 45 cycles
- Non interprétable avec un Ct compris entre 35 et 45 cycles.

	COMPRESSE	ECOUVILLON COTON	ECOUVILLON POLYESTER
Flacon en zone décartonnage (P1)	NI (> 35 cycles)	NI (> 35 cycles)	NI (> 35 cycles)
Bac en plastique ayant servi au transport (P2)	Absence	Absence	Absence
Flacon dans l'isolateur (P3)	Absence	Absence	Absence
Seringue remplie (P4)	Absence	Présence (Ct : 33,6)	Absence
Gants (P5)	Présence (Ct : 29,7)	Présence (Ct : 32,3)	Présence (Ct : 33,5)
Plan de travail de l'isolateur (P6)	Absence	Absence	NI (> 35 cycles)
Vitre de l'isolateur (P7)	NI (> 35 cycles)	Absence	NI (> 35 cycles)
Sachet de la préparation dans l'isolateur (P8)	NI (> 35 cycles)	Absence	NI (> 35 cycles)
Sachet de la préparation en zone de contrôle (P9)	NI (> 35 cycles)	NI (> 35 cycles)	NI (> 35 cycles)

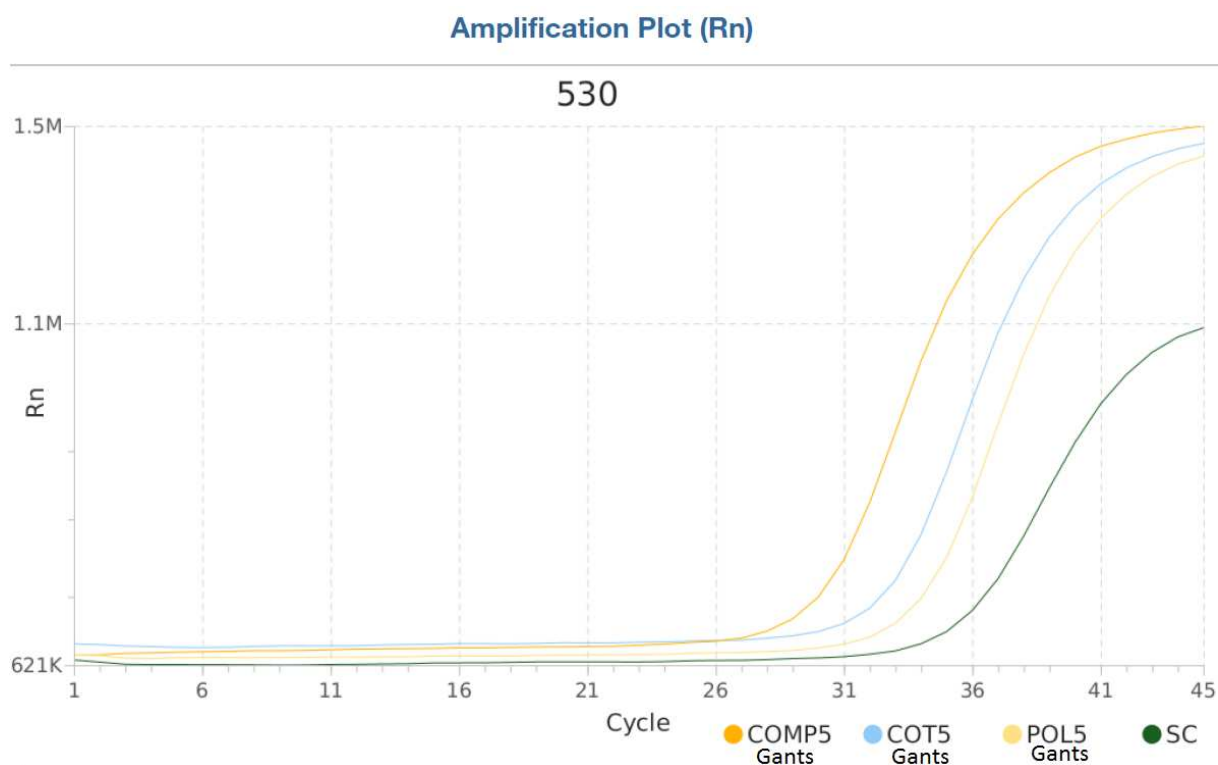
**TABLEAU 6 : Résultats de la présence de rAd-IFN dans les prélèvements surfaciques en fonction du dispositif de prélèvement**

La compresse de protection entourant le flacon dans l'emballage du laboratoire n'apparaît pas dans ce tableau, elle ne présente pas d'ADN viral lors de l'analyse par PCR.

Sur les 27 prélèvements effectués, 4 démontrent la présence d'adénovirus, 12 l'absence et 11 ne sont pas interprétables.



## e) Quantification des échantillons positifs



**Figure 24 :** Analyse des prélèvements surfaciques positifs par qPCR

Pour connaître la quantité de rAd-IFN retrouvée dans ces 4 prélèvements, nous avons utilisé la pente de la gamme standard à partir de laquelle nous obtenons le nombre de particules contenu dans 10  $\mu\text{L}$  d'extraction. Nous multiplions ce chiffre par 5 pour obtenir le volume total extrait de 50  $\mu\text{L}$ . La quantité retrouvée dans l'extraction correspond en principe à la quantité contenue dans les 400  $\mu\text{L}$  du culot obtenu après extraction des prélèvements.

Type échantillon	Ct (cycles)	Nombre de particules dans 10 $\mu\text{L}$ extrait	Nombre de particules dans le prélèvement
COT 4 (seringue)	33.6	40.8	$2,04 \cdot 10^2$
COMP 5 (gant)	29.7	529.7	$2,65 \cdot 10^3$
COT 5 (gant)	32.3	96.1	$4,8 \cdot 10^2$
POL 5 (gant)	33.5	43.6	$2,18 \cdot 10^2$

**TABLEAU 7 :** Nombre de particules de rAd-IFN présentes dans les prélèvements surfaciques positifs



## **Partie III : Discussion**

En France, la recherche de contamination virale, par un médicament de thérapie génique, dans une unité de préparation d'une PUI n'a pas encore été étudiée à ce jour. L'aspect innovant de cette étude est très intéressant, néanmoins, l'absence de données disponibles sur ce sujet n'ont pas rendu le travail aisé. Nous nous sommes aidés de l'expérience sur la contamination chimique déjà bien étayée dans la littérature.

La mise en place de cette méthode de détection n'aurait pas pu se faire sans les connaissances et l'expérience en analyse virologique du laboratoire de l'IPL. Les manipulations, auxquelles nous avons assistées, ont été réalisées à l'IPL par une technicienne du laboratoire de virologie.

Le médicament de thérapie génique analysé étant en cours d'étude clinique, nous avons donc été dépendant des inclusions, à la fois pour récupérer du produit pur, mais aussi pour effectuer nos prélèvements de surface au cours d'une mise en seringue du produit pour un patient.

La méthodologie initialement prévue n'a pas pu être respectée, compte tenu de la crise sanitaire de la Covid19 des derniers mois, qui a eu deux conséquences directes : l'accès limité aux laboratoires de recherche et la probable diminution d'inclusion de patient dans l'étude Trizell.

### **A) Discussion sur notre méthodologie**

#### **1) La méthode de détection par qPCR**

- Choix de la technique

La méthode de détection par qPCR était la seule envisageable dans notre cas pour cet adénovirus non répliatif comme détaillé plus haut. Nous avons eu la chance de pouvoir travailler en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille qui détient l'automate nécessaire et les compétences pour la manipulation.

- Choix du kit

Nous avons sélectionné, en premier lieu, un kit complet comprenant le kit d'extraction et de qPCR car il nous semblait plus pratique d'utiliser le même fournisseur pour les deux manipulations. Finalement, au vu de l'indisponibilité du kit d'extraction, nous avons utilisé des fournisseurs différents pour les kits d'extraction et de qPCR, mais cela ne semble pas avoir eu de répercussions sur les résultats.

- Coût de la technique

Le coût de l'analyse n'est pas négligeable, il est estimé à environ 16€ par puits analysé, comprenant les kits, les réactifs, l'utilisation de l'automate et le personnel de l'IPL, soit 800€ pour la série de prélèvements effectués au cours de ce travail. Ce coût est à prendre en compte, surtout si un suivi régulier de la contamination virale au sein d'une unité de préparation est envisagé.

- Déroulement des analyses

Nous avons envisagé de valider dans un premier temps la méthode de détection grâce aux dilutions à partir du produit pur lors d'une première analyse par qPCR. Dans un second temps, et seulement si celle-ci était validée, il était question de réaliser et d'analyser les prélèvements de surface. Cependant, nous n'avons pu réaliser qu'une seule analyse par qPCR en raison de la situation sanitaire et l'accès limité aux laboratoires de recherche. De ce fait, nos prélèvements surfaciques ont été réalisés avant la validation de la méthode de détection.

- Mode opératoire des dilutions de produit pur

Pour la réalisation des dilutions à partir du produit pur, nous avons utilisé une méthode de dilution en série, ce qui augmente le risque de répercussion d'erreur comparé à des dilutions simples. Toutefois, étant donné la forte concentration du produit de départ, le volume de dilution aurait été trop important pour réaliser des dilutions simples afin d'obtenir des concentrations proches de la gamme standard.

## 2) L'étape d'extraction

### - Mode opératoire de l'extraction

Pour l'extraction, le kit QIAamp® DNA Mini propose plusieurs modes opératoires selon le matériel biologique analysé (prélèvement sang/tissu/buccal). Nous avons retenu le protocole « blood or body fluid » du kit (Annexe 2) car il semble correspondre le mieux à notre type de prélèvement : il s'agit d'un milieu fluide sans tissu ni cellules à lyser.

Le volume de 200µL utilisé pour l'extraction des dilutions a été choisi selon le protocole du kit QIamp. Cependant nous n'avons pas pu respecter ce volume pour les prélèvements. En effet, le tampon de lyse doit être ajouté volume à volume pour la première étape d'extraction. Pour nos prélèvements contenant 2,5mL et 3 mL, il nous était impossible d'ajouter le tampon de lyse à volume égal car nous étions limité par le volume fourni par le kit. Ainsi, nous avons décidé de centrifuger les prélèvements, enlever le surnageant et conserver uniquement 400µL du culot. Ce volume nous paraît un bon compromis entre l'analyse de l'ensemble de l'échantillon et l'analyse de 200µL qui pourrait réduire le nombre de particules virales analysées.

Pour les prochaines analyses, il sera nécessaire de réduire le volume de PBS trop important et trouver un compromis entre l'immersion totale du dispositif, importante pour la bonne conservation de nos échantillons, et le volume minimal de PBS nécessaire. Nous savons déjà que l'utilisation d'un écouvillon plutôt que d'une compresse permet de réduire ce volume.

### - Contamination

Comme exposé précédemment, deux conditions de validation de la méthode par qPCR sur les trois demandées sont respectées pour notre analyse.

La contamination de la qPCR a certainement été causée par la trop forte concentration en particules virales de la gamme de dilution et des témoins positifs.

La contamination a pu avoir lieu :

- Lors de l'extraction, avec aérosolisation entre les échantillons lors du pipetage ou par la contamination d'un cône souillé ;
- Lors de la PCR, par aérosolisation des ADN extraits qui ont contaminé soit le flacon du pré-mix d'amplification, soit les puits de la plaque de PCR.

Si la contamination a eu lieu lors de l'extraction, nous n'avons pas d'autre choix que d'effectuer de nouveaux prélèvements et procéder à une nouvelle extraction. Seulement, pour les réaliser, nous devons attendre l'inclusion de nouveaux patients dans le protocole.

Par contre, si la contamination a eu lieu lors de la préparation de la plaque de PCR, il est possible de réanalyser les éluats de l'extraction de nos prélèvements que nous avons conservés (pour rappel, nous avons utilisé 10µL d'éluat sur un volume total de 50µL, ces éluats congelés sont stables pendant un an).

Ainsi, nous avons choisi d'effectuer une seconde PCR à partir des éluats restants en prenant un nouveau tube de premix du kit encore scellé et donc non contaminé. Pour cette nouvelle analyse, nous n'avons pas réanalysé les éluats de la gamme de dilution, des témoins positifs et provoqués, à risque de contamination par leur forte concentration.

Sur cette seconde PCR, il s'est avéré que le témoin de contrôle IC+WO était également visible à 530nm, témoin d'une contamination. Nous en avons conclu que la contamination avait eu lieu lors de l'extraction.

Lors des prochains prélèvements, il sera nécessaire de prendre les précautions requises pendant l'étape d'extraction pour éviter la contamination par les points les plus fortement concentrés. Il serait préférable de réaliser les extractions des tests positifs et provoqués séparément de celles des prélèvements surfaciques.

### **3) Le plan de prélèvements**

Les points de prélèvement ont été choisis en fonction de notre expérience concernant la contamination chimique et la littérature scientifique à ce sujet (41,42). Pour rappel, les points les plus fréquemment contaminés par les cytotoxiques en unité de préparation sont la zone de stockage, l'emballage primaire et secondaire des flacons, l'isolateur en particulier les gants et le champ de préparation, les poignées de porte, ainsi que la zone de contrôle.

Comme pour la majorité des virus nus, les adénovirus sont stables plusieurs semaines sur une surface inerte. Cette caractéristique nous a permis de le détecter sur nos surfaces de préparation. Cependant, ce paramètre ne sera pas valable pour tous les produits de thérapie génique que nous rencontrerons, en fonction du vecteur utilisé.

Pour le plan de prélèvement établi, nous n'avons pas pris en compte le type de matière à prélever : la technique de prélèvement utilisée était la même quel que soit la zone prélevée. En effet, l'étude de *Julian et al. de 2011* (43) nous fournit des données pour les prélèvements sur

le PVC et l'acier, mais nous n'avons pas de données pour le verre (flacon) ou le nitrile (gants).

Nous avons souhaité déterminer l'efficacité de nos méthodes de confinement telle que la préparation en isolateur avec des prélèvements réalisés dans l'enceinte de l'isolateur.

Nous avons également souhaité tester l'efficacité des moyens de décontamination. Pour cela nous avons réalisé un prélèvement sur le flacon avant décontamination à l'eau de Javel, un prélèvement après entrée dans l'isolateur et donc après cette décontamination à l'eau de Javel et la décontamination au peroxyde d'hydrogène du sas d'entrée de l'isolateur. Par contre nous n'avons pas testé l'efficacité du nettoyage finale de l'isolateur par l'Anioxy-spray et la stérilisation de celui-ci en fin de préparation.

Il sera indispensable à l'avenir de réaliser des prélèvements post décontamination dans les locaux où nous avons retrouvés des positifs afin de vérifier que nos moyens de décontamination permettent d'éliminer cette contamination.

#### **4) La méthode de prélèvement**

##### **- Surface de prélèvement**

La surface de prélèvement de 100cm<sup>2</sup> que nous avons définie initialement n'a pas pu être respectée pour l'ensemble des prélèvements : certains points, comme la seringue ou le flacon, ne permettent pas de prélever sur une surface aussi grande. Cette information est à prendre en compte si nous voulions établir une concentration virale par cm<sup>2</sup> ou comparer des points de prélèvements de surfaces différentes entre eux. Dans notre cas, nous pouvons juste confirmer l'absence ou la présence de contamination virale. La surface de prélèvements pourrait être réévaluée et diminuée jusqu'à 20cm<sup>2</sup> selon la norme NF EN ISO 14698-1. Cependant, plus nous diminuons la surface, plus nous diminuons la potentielle quantité de virus retrouvée.

##### **- Humidification du dispositif**

Pour éviter un biais, nous avons choisi de pré-humidifier l'ensemble des dispositifs de prélèvement avec 100µL de PBS pour garder la même méthodologie. Cependant, les écouvillons floqués ne nécessitent pas d'humidification préalable selon leur fiche technique. Si le choix du dispositif se portait sur cet écouvillon, l'étape de pré humidification pourrait être supprimée ce qui simplifierait le prélèvement. Nous pourrions également utiliser le milieu de transport fourni avec l'écouvillon (milieu de transport viral dont la composition n'est pas détaillée).

- Conservation des prélèvements

Pour la conservation des prélèvements, le volume de PBS introduit dans le tube Falcon était différent entre les écouvillons (2mL) et les compresses (3.5mL) pour leur immersion complète, ce qui peut apporter un biais dans l'analyse par augmentation de la dilution des particules virales. Cependant, lors de la centrifugation des échantillons avant extraction, nous considérons que la majorité des particules virales se retrouvent dans le culot.

Après prélèvements, les échantillons étaient congelés le plus rapidement possible pour assurer la préservation des particules virales. Nous ne connaissons pas l'impact du délai entre la réalisation des prélèvements et leurs congélations pour le rAd-IFN. Dans notre cas, ce délai était de 15 à 30 minutes en moyenne.

- Dispositif de prélèvement :

Il faut prendre en compte l'aspect pratique du prélèvement avec les différents dispositifs:

- Il est plus facile et plus rapide de prélever avec un écouvillon déjà prêt à l'emploi. Même si le prélèvement surfacique par compresse a pour avantage d'être déjà connu et utilisé en routine par l'équipe, la manipulation de la compresse avec les pinces Kocher n'est pas aisée. Le prélèvement nécessite la préparation en amont des tubes Falcon, à remplir avec du PBS. Il serait avantageux de réduire le temps de prélèvement avec un dispositif prêt à l'emploi, sans préhumidification, d'autant plus si celui-ci peut être fourni avec le milieu de conservation.
- La méthode par essuyage par compresse est la plus chronophage : il faut préalablement couper les compresses en deux pour permettre leur immersion totale dans le PBS, et avoir l'aisance de les plier avec les pinces Kocher et de les insérer dans le tube Falcon.
- Pour le dépôt du dispositif dans le tube Falcon, un trait de sécabilité existe déjà sur l'écouvillon polyester ce qui facilite la tâche, contrairement à l'écouvillon en bois qu'il faut réussir à casser à la bonne hauteur. Pour les compresses, il est compliqué de les faire tomber jusqu'au fond du tube Falcon et nous avons dû utiliser un dispositif à usage unique pour faciliter leur immersion.
- De plus, il a été difficile pour le technicien de laboratoire de récupérer 400 $\mu$ L de culot pour les prélèvements réalisés avec une compresse. En effet, celle-ci étant très absorbante, et au vu de la difficulté de la presser contre la paroi du tube Falcon avec le cône de la micropipette, la totalité du volume n'a pas pu être récupérée. Cependant,



cette difficulté de manipulation ne semble pas avoir affecté les résultats puisque le test de contamination provoquée avec la compresse reste, malgré tout, assez performant.

L'aspect économique est aussi à prendre en compte : 0€04 centimes pour l'écouvillon en coton, 0€30 pour l'écouvillon en polyester floqué et 0€38 pour la compresse avec l'utilisation de deux pinces Kocher.

Aussi, la technique avec les compresses génère davantage de déchets (pince Kocher en plus), ces déchets devant être éliminés dans les DASRI spécifiques OGM.

## **B) Discussion sur les résultats des analyses par qPCR**

### **1) Validation de la méthode de détection**

La détection de l'adénovirus modifié lors des tests positifs (tableau 4) et la bonne amplification de la gamme de dilution (figure 20 et tableau 3) nous permettent d'attester que la méthode par qPCR est efficace pour la détection du rAd-IFN.

Les tests négatifs sont non interprétables et témoignent probablement de la contamination durant l'extraction (figure 21).

Les tests positifs sont confirmés pour les trois dispositifs de prélèvement avec un Ct inférieur à celui de la contamination. Ce qui est rassurant et permet de confirmer que la méthode de détection qPCR fonctionne et que chacun des dispositifs absorbe convenablement le virus.

Ces tests positifs nous permettent également de valider notre mode de conservation. Dans ce cas précis, les dispositifs ont été conservés 43 jours à une température de -80°C dans du PBS.

### **2) Analyse des résultats pour les prélèvements surfaciques**

Les échantillons qui sont positifs, gants et seringue préparée, sont des prélèvements effectués dans l'isolateur, ce qui est plutôt rassurant pour la protection du personnel car c'est la zone la plus confinée (tableau 6). De plus, la mise en évidence de l'acide nucléique ne permet pas d'attester de l'état infectieux du virus. En effet, nous pouvons détecter l'ADN d'un virus mort, non infectieux, qui ne représenterait aucun risque pour le personnel manipulant. Pour savoir si un virus est vivant, il faudrait le mettre en culture ce qui est dans notre cas impossible au vu du caractère non répliatif du virus. Par ailleurs, nous rappelons que le gant

prélevé correspond au gant stérile que nous mettons en plus dans l'isolateur (sur-gant) et non au gant néoprène de l'isolateur.

Néanmoins, le risque de contamination croisée doit être analysé comme nous utilisons le même isolateur pour la préparation de cytotoxiques. Il sera nécessaire, dans un second temps, de tester nos méthodes de décontamination pour s'assurer que cette contamination soit correctement éliminée.

Par ailleurs, nous devons confirmer avec davantage de prélèvements que cette contamination détectée sur les gants n'est pas retrouvée sur le sachet de la préparation qui est ensuite envoyé dans le service de soins. En effet, concernant le prélèvement sur le sachet de la préparation dans l'isolateur, nous ne pouvons pas conclure à l'absence de rAd-IFN étant donné qu'au moins un dispositif sur trois est non interprétable. De même pour le prélèvement effectué sur le sachet en zone de contrôle, avant envoi dans le service de soins, celui-ci est non interprétable. Lors de la prochaine manipulation, il sera essentiel de confirmer ces points douteux.

Pour la seringue remplie, seul l'écouvillon en coton démontre la présence d'adénovirus, contrairement à l'écouvillon en polyester et la compresse. Néanmoins, la surface de la seringue que nous avons prélevé n'est pas la même pour chacun des dispositifs, ce qui pourrait expliquer qu'un seul prélèvement soit positif.

En parallèle avec la contamination chimique connue sur les flacons de cytotoxiques, nous pourrions nous attendre à avoir une contamination sur le flacon du rAd-IFN. Cependant, les prélèvements réalisés en zone de décartonnage avant décontamination à l'eau de Javel sont non interprétables et ceux réalisés sur le flacon dans l'isolateur sont négatifs (après décontamination du flacon à l'eau de Javel en zone décartonnage et au peroxyde d'hydrogène 35% dans le sas d'entrée de l'isolateur). Ces points seront également à confirmer lors d'une future manipulation.

Si nous confirmons l'absence de particules virales sur le flacon dans l'isolateur, nous pouvons alors nous poser la question de l'origine de la contamination sur les gants. Celle-ci proviendrait probablement du mode de préparation malgré l'utilisation d'un système clos Phaseal®. L'interne en pharmacie ayant fait la mise en seringue du rAd-IFN dans l'isolateur est formé à l'utilisation du système Phaseal®, toutefois il ne manipule pas quotidiennement, contrairement aux préparateurs en pharmacie. Nous pouvons nous poser la question d'une

mauvaise utilisation de celui-ci qui aurait provoqué cette contamination. Nous pourrions filmer la prochaine manipulation pour observer et contrôler les différentes étapes à risque.

Pour les prélèvements sur le bac en plastique de transport et le flacon dans l'isolateur, on conclut à l'absence de particules virales pour les 3 dispositifs.

Pour le plan de travail, la vitre de l'isolateur et le sachet de la préparation dans l'isolateur, nous ne pouvons pas conclure à l'absence de rAd-IFN étant donné qu'au moins un dispositif sur 3 est non interprétable.

La compresse de protection entourant le flacon dans l'emballage du laboratoire ne présente pas de particules virales. Cependant, il s'agissait d'un test supplémentaire : nous ne connaissons ni sa taille ni sa composition, et nous ne savons pas si nos méthodes d'analyse lui étaient applicables.

L'élargissement du nombre de points testés et la répétition des prélèvements sera obligatoire pour pouvoir conclure. Il sera aussi très important d'effectuer des prélèvements après nettoyage et stérilisation de l'isolateur, par exemple sur la paillasse, la vitre et les gants, pour être certain d'éliminer toute trace de rAd-IFN et pouvoir manipuler les cytotoxiques à la suite sans risque de contamination croisée.

### **3) Comparaison des résultats en fonction du dispositif de prélèvement**

Pour les tests de contamination provoquée, l'écouvillon en polyester semble être le plus performant (tableau 5) : avec un Ct à 11,5 cycles et une différence entre le nombre de particules attendu et analysé par PCR le plus faible (-0,99 log). Le prélèvement par compresse est en seconde position (11,7 cycles ; -1,2 log) puis l'écouvillon en coton (15,6 ; -2,31 log).

L'écouvillon en polyester floqué semble être la méthode de choix pour les prélèvements, ce qui coïncide avec l'étude de *Julian et al.* de 2011 mentionnée dans la 2ème partie (43). Néanmoins, il est difficile de conclure à la supériorité d'un des dispositifs de prélèvement sur le seul test de contamination provoquée réalisé et il est essentiel de répéter ces tests plusieurs fois pour pouvoir conclure. En effet, dans la publication de *Julian et al. de 2011*(43), ces tests de contamination provoquée étaient répétés 8 à 10 fois et analysés statistiquement. Nous n'avons pas pu en réaliser autant, au vu du peu de produit pur que nous avons à disposition

mais ces prélèvements seront à reproduire systématiquement lors de la réalisation des futures préparations.

Il aurait été plus probant de valider l'un des dispositifs, en comparant les tests de contamination provoquée, avant d'effectuer les prélèvements surfaciques. Néanmoins, en raison des limites évoquées précédemment, cela n'a pas été possible.

#### **4) Quantification de notre dilution et des prélèvements positifs**

En utilisant la gamme standard du kit, et grâce à la courbe standard établie (figure 19), nous avons déduit la quantité de particules virales présente dans chacun des échantillons analysés.

Pour les dilutions : nous perdons en moyenne 1,27 log entre la concentration de la dilution et la concentration analysée par PCR. Cette diminution n'est pas aberrante et est certainement liée à l'étape d'extraction. De plus, les dilutions et les tests provoqués ont été réalisés à partir de deux reliquats de flacons qui avaient déjà subi une décongélation/recongélation : le 12/12/2019 pour le premier flacon et le 23/01/20 pour le second. Ainsi, nous ne sommes pas certains de la concentration de départ de  $3.10^8$  particules virales/ $\mu\text{L}$  car nous ne connaissons pas l'impact d'une re-congélation sur le produit.

Pour les prélèvements : nous retrouvons  $2,04.10^2$  particules virales sur la seringue avec l'écouvillon coton et jusqu'à  $2,65.10^3$  particules sur les gants en fonction du dispositif de prélèvement utilisé. Toutefois, les prélèvements ayant eu lieu sur des surfaces différentes des gants, nous ne pouvons pas comparer les trois dispositifs entre eux.

Il faut prendre en compte que la matière des gants en nitrile diffère des autres composants de l'isolateur que nous avons prélevé et qu'elle n'est pas évoquée dans l'étude de *Julian et al.* de 2011(43).

La quantité retrouvée de rAd-IFN dans les prélèvements représente le nombre de particules virales récupérées, extraites puis analysées. Nous pouvons supposer que la quantité réelle présente sur les gants était supérieure.

Si nous étions en contact direct avec un adénovirus sauvage, cette quantité inhalée pourrait être suffisante pour provoquer une infection selon l'étude de *Couch* (22). Cependant, il ne faut pas oublier que le Rad-IFN est non répliquatif, et qu'en principe, il ne se multiplie pas chez l'hôte. Et que par principe de précaution, la mise en seringue est effectuée dans une enceinte fermée et avec des équipements de protection individuels efficaces.

## C) Perspectives

Notre objectif principal est atteint avec la validation de la méthode de détection par qPCR, malgré la contamination lors de l'étape d'extraction qui impliquera des mesures de précaution lors des futures manipulations.

Concernant notre méthode de prélèvement surfacique, la méthode par essuyage semble être efficace. Pour conclure à la supériorité de l'un des dispositifs de prélèvement, il faudra réitérer les tests de contamination provoquée plusieurs fois en utilisant les reliquats de flacons des futures préparations.

Suite à notre expérience lors des prélèvements et malgré un coût plus élevé, nous préfererions opter pour un écouvillon prêt à l'emploi fourni avec le milieu de transport viral, de préférence l'écouvillon en polyester floqué. Cependant ce choix devra être confirmé avec les résultats des tests de contamination provoquée répétés.

Concernant la contamination virale détectée, la seringue complétée et les gants en nitrile de l'isolateur ont été contaminés en dépit des précautions prises et l'utilisation d'un système clos. Il est difficile à ce jour d'identifier la source de la contamination à partir du peu de prélèvements réalisés au cours de ce travail. Mais il sera essentiel de confirmer l'absence de contamination après décontamination de notre isolateur.

Il serait intéressant de tester l'efficacité des différentes méthodes de décontamination à notre disposition: eau de Javel 5%, vapeur de peroxyde d'hydrogène à 35%, désinfectant Anioxy-spray.

Sachant que la contamination chimique est très souvent manuportée, nous pouvons penser qu'il en est de même pour la contamination virale, c'est pourquoi nous avons souhaité tester les gants de l'isolateur qui nous paraissait les plus à risques, mais nous pourrions multiplier les prélèvements sur les gants à différentes étapes du circuit. De plus, malgré le fait que le nitrile n'ait pas été étudié dans la littérature, cette matière semble permettre la détection du virus selon notre méthode au vu de nos résultats.

Nous pourrions également ajouter des prélèvements dans le local de stockage (flacon/gants) et le local des déchets (DASRI rigide/gants) que nous n'avions pas intégré initialement dans notre plan de prélèvements et qui représente, malgré tous, des étapes à risque.

Ce travail nous a permis d'acquérir des connaissances en virologie et notre regard sera plus critique sur les prochains produits de thérapie génique. Ce travail démontre également la nécessité d'établir une étude de faisabilité pour tout nouveau médicament de thérapie génique.

## **Conclusion :**

Notre objectif principal a été atteint puisque nous avons réussi à valider une méthode de détection par qPCR d'un adénovirus modifié contenu dans notre médicament de thérapie génique.

Nous avons constaté une contamination virale au sein de notre isolateur, ce qui démontre l'intérêt des mesures de confinement, mais également, l'intérêt de développer des moyens de contrôle comme celui-ci.

Ce moyen de contrôle devra être mis en place temps que le risque de contamination croisée existe et que nous n'avons pas à disposition une salle de préparation dédiée à la thérapie génique.

Les risques liés à une exposition du personnel sont faibles étant donné le caractère non répliquatif du virus contenu dans le médicament. Cependant, il est tout de même nécessaire d'appliquer le principe de précaution et ces essais nous permettent d'optimiser notre circuit pour pouvoir accueillir les éventuelles prochaines thérapies géniques, ce qui est très probable au vu de l'essor de ces traitements lors de ces dernières années.

Pour chaque nouvelle thérapie génique utilisant un vecteur viral et nécessitant une manipulation, nous devons valider à nouveau notre méthode de détection, et réfléchir à notre circuit en fonction des risques identifiés et des caractéristiques du virus.





# **Bibliographie**

1. Abedia indication. J Gene Med [Internet]. 2019; Available from: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>
2. Règlement 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) no 726/2004, Journal officiel de l'union Européenne, L324, 10.12.2007, p. 121–137.
3. Directive 2001/83/CE du parlement européen et du conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Journal Officiel, L 311 du 28.11.2001, p. 67.
4. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Internet]. [cited 2020 Sep 3]. Available from: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>
5. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. médecine/sciences. 2019 Apr 1;35(4):316–26.
6. HAS. Avis de la commission de transparence concernant l'acicabtagene ciloleucel (Yescarta®). Dec 5, 2018.
7. HAS. Avis de la commission de transparence concernant le tisagenlecleucel (Kymriah®). Dec 12, 2018.
8. HAS. Avis de la commission de transparence concernant le voretigène neparvovec (Luxturna®). 2019 Apr.
9. Vector used in gene therapy clinical trials. J Gene Med [Internet]. Available from: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
10. Basu J, Willard HF. Artificial and engineered chromosomes: non-integrating vectors for gene therapy. Trends Mol Med. 2005 May;11(5):251–8.
11. Dossier : Thérapie génique : une nouvelle frontière pour la recherche médicale. La Recherche. 1998 Dec;(Mensuel N°315).
12. Staff WHO, Organization WH. Laboratory Biosafety Manual. World Health Organization; 2004. 196 p.


13. Hacein-Bey-Abina S, Pai S-Y, Gaspar HB, Armant M, Berry CC, Blanche S, et al. A Modified  $\gamma$ -Retrovirus Vector for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2014 Oct 9;371(15):1407–17.
14. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 2001 Jan;7(1):33–40.
15. Lannoy N. Nathalie Lannoy, Cédric Hermans. Thérapie génique en 2017: Etat des lieux et perspectives *Louvain Med*. 2017 ; 136 (1): 1-8. *Louvain Méd*. 2017 Jan 30;136:1–8.
16. Wold WSM, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013 Dec;13(6):421–33.
17. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 1999 Oct 1;10(5):440–7.
18. Lai CM, Lai YKY, Rakoczy PE. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol*. 2002 Dec;21(12):895–913.
19. Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(5):753–70.
20. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther*. 2004 Dec;15(12):1157–66.
21. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006 Aug 16;6(1):130.
22. Couch RB, Knight V, Douglas RG, Black SH, Hamory BH. The minimal infectious dose of adenovirus type 4; the case for natural transmission by viral aerosol. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1969;80:205–11.
23. Patel SC, Dowell JE. Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Targets Ther*. 2016 May 3;7:63–72.
24. Zucali PA, Perrino M, Lorenzi E, Ceresoli GL, De Vincenzo F, Simonelli M, et al. Vinorelbine in pemetrexed-pretreated patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Amst Neth*. 2014 Jun;84(3):265–70.
25. Delaunay T, Achard C, Boisgerault N, Grard M, Petithomme T, Chatelain C, et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J Thorac Oncol*. 2020 Jan 13;S1556-0864(20)30019-8:Epub ahead of print.

26. Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, Kumagai N, Chen Y, Murakami S, et al. Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Oct;45(4):795–803.
27. Bracci L, Proietti E, Belardelli F. IFN- $\alpha$  and Novel Strategies of Combination Therapy for Cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1112(1):256–68.
28. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Mar;16(3):131–44.
29. Serman DH, Haas A, Moon E, Recio A, Schwed D, Vachani A, et al. A Trial of Intrapleural Adenoviral-mediated Interferon- $\alpha$ 2b Gene Transfer for Malignant Pleural Mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1395–9.
30. Serman DH, Alley E, Stevenson JP, Friedberg J, Metzger S, Recio A, et al. Pilot and Feasibility Trial Evaluating Immuno-Gene Therapy of Malignant Mesothelioma Using Intrapleural Delivery of Adenovirus-IFN $\alpha$  Combined with Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 1;22(15):3791–800.
31. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of Adenovirus and Its Use as a Vector for Gene Therapy. *Hum Gene Ther*. 2004 Nov 1;15(11):1022–33.
32. Article L531-1. Code de l'environnement Jun 27, 2008.
33. Haut Conseil Biotechnologie. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés. 2013.
34. Haut Conseil Biotechnologie. Comité scientifique : avis en réponse à la saisine du MESRI sur le dossier de thérapie génique 5432. Paris; 2019.
35. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Bonnes Pratiques de Préparation publiée au JO. Nov 21, 2007.
36. ANSM. Document en enquête publique LD2: Préparation de médicaments contenant des substances pouvant présenter un risque pour la santé et l'environnement. Jun, 2020.
37. Brouwers EEM, Huitema ADR, Bakker EN, Douma JW, Schimmel KJM, van Weringh G, et al. Monitoring of platinum surface contamination in seven Dutch hospital pharmacies using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007 Aug;80(8):689–99.

38. Schmaus G, Schierl R, Funck S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm*. 2002 May 15;59(10):956–61.
39. Power LA, Sessink PJM, Gesy K, Charbonneau F. Hazardous Drug Residue on Exterior Vial Surfaces: Evaluation of a Commercial Manufacturing Process. *Hosp Pharm*. 2014 Apr;49(4):355–62.
40. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):49–78.
41. Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Charache P. PCR Method for Detection of Adenovirus in Urine of Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *J Clin Microbiol*. 1998 Nov 1;36(11):3323–6.
42. Rodino KG, Espy MJ, Buckwalter SP, Walchak RC, Germer JJ, Fernholz E, et al. Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol*. 2020 26;58(6).
43. Petit O. Maîtrise de la contamination chimique de surface des zones à atmosphère contrôlée d'une unité de préparation centralisée des cytotoxiques [Thèse de Doctorat]. [Université de Lille]: Faculté de Pharmacie; 2019.
44. Petit M, Curti C, Roche M, Marc M, Charleric B, Vanelle P. Environmental monitoring by surface sampling for cytotoxics: a review. *Environ Monit Assess*. 2017 Jan;189(2):52.
45. Julian TR, Tamayo FJ, Leckie JO, Boehm AB. Comparison of Surface Sampling Methods for Virus Recovery from Fomites ▽. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Oct;77(19):6918–25.
46. Miller WS, Artenstein MS. Aerosol Stability of Three Acute Respiratory Disease Viruses. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967 May 1;125(1):222–7.
47. Triquetl R, Boutry M, Donade A. La conservation par le froid des échantillons biologiques. 1996;3.
48. ISO 14698-1:2003(fr), Salles propres et environnements maîtrisés apparentés — Maîtrise de la biocontamination — Partie 1: Principes généraux et méthodes [Internet]. [cited 2020 Jul 30]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14698:-1:ed-1:v1:fr>
49. Landers TF, Hoet A, Wittum TE. Swab Type, Moistening, and Preenrichment for *Staphylococcus aureus* on Environmental Surfaces. *J Clin Microbiol*. 2010 Jun;48(6):2235–6.

# Annexes

## ANNEXE 1: Plan de prélèvement virologique de surface dans les isolateurs de l'UPCC et analyse à l'institut Pasteur

 Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille <b>Pôle S3P</b> Institut de pharmacie	FICHE D'ENREGISTREMENT
	UNITÉ DE PRÉPARATION CENTRALISÉE DES CYTOTOXIQUES <i>PLAN DE PRELEVEMENTS VIROLOGIQUE DE SURFACE DE L'UPCC ET ANALYSE A L'INSTITUT PASTEUR</i>

Nom manipulateur UPCC : DANCKAERT ALICE / PINTURAUD MARINE

Nom Manipulateur IP : Peggy Bouquet / Alice Danckaert

### **Prélèvements de surface et test positif**

Numéro lot du reliquat du flacon utilisé : rAd-IFN 160201-2-155122

Date et heure des prélèvements en zone décartonnage : 25/06/20 à 11h30 par AD

Date et heure des prélèvements en isolateurs : 25/06/20 de 12h00 à 13h00 par AD

Date et heure des prélèvements en zone Assurance Qualité (AQ): 25/06/20 à 13h05 par MP

Date et heure de la congélation des prélèvements zone décartonnage : 25/06/20 à 12h00

Date et heure de la congélation des prélèvements isolateur et AQ : 25/06/20 à 13h30

### **Test provoqués et test négatif**

Numéro lot des reliquats des 2 flacons utilisés : rAd-IFN 160201-2-153295

Le premier a été décongelé une première fois le 12/12/19 et recongelé en attente de l'analyse.

Le second a été décongelé une première fois le 23/01/20 et recongelé en attente de l'analyse.

Date et heure des prélèvements en isolateur : 15/07/20 à 17h30 par AD


Date et heure de la congélation des prélèvements : 15/07/20 à 18h00 par AD

### **A remplir par l'équipe de l'institut Pasteur :**

Date et heure de la décongélation des échantillons : 14/08/20 à 8h00

Date de l'extraction: Heure de début : 10h00      Heure de fin : 13H20

Date de réalisation des PCR : 14/08/20    Heure de début : 15h00    Heure de fin : 17h40


 Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille <b>Pôle S3P</b> <b>Institut de pharmacie</b>	<b>FICHE D'ENREGISTREMENT</b> <b>UNITÉ DE PRÉPARATION CENTRALISÉE DES CYTOTOXIQUES</b>
	<b>PLAN DE PRELEVEMENTS VIROLOGIQUE DE</b> <b>SURFACE DE L'UPCC ET ANALYSE A L'INSTITUT</b> <b>PASTEUR</b>

**PARTIE I : PRELEVEMENT EN ZONE DECARTONNAGE**

**Date et heure de prélèvement :** 25/06/20 à 11h30 **Préleveurs :** AD

Type de prélèvement	Description / Localisation		Commentaires UPCC ET IP
10cm <sup>2</sup> Essuyage avec compresses 2.5*2.5cm + PPS 100µL	COMP 1	Flacon en zone décartonnage	
	COMP 2	Bac en plastique ayant servi au transport des EC à la zone décartonnage	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon Cotton + PPS 100µL	COT 1	Flacon en zone décartonnage	
	COT 2	Bac en plastique ayant servi au transport des EC à la zone décartonnage	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon Polyester + PPS 100µL	POL 1	Flacon en zone décartonnage	
	POL 2	Bac en plastique ayant servi au transport des EC à la zone décartonnage	
Compresse de protection dans l'emballage fourni par le laboratoire	EMB	Pas de prélèvement effectué : compresses entourant le flacon lors du transport et fourni par le laboratoire	


**Eventuels incidents techniques à signaler :** Non

 <p>Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille <b>Pôle S3P</b> Institut de pharmacie</p>	<b>FICHE D'ENREGISTREMENT</b> <b>UNITÉ DE PRÉPARATION CENTRALISÉE DES CYTOTOXIQUES</b>
	<b>PLAN DE PRELEVEMENTS VIROLOGIQUE DE SURFACE DE L'UPCC ET ANALYSE A L'INSTITUT PASTEUR</b>

## **PARTIE II : PRELEVEMENT DANS L'ISOLATEUR**

**Date et heure de prélèvement :** 25/06/20 12h à 13h      **Préleveurs :** AD

Type de prélèvement	Description / Localisation		Commentaires UPCC ET IP
10cm <sup>2</sup> Essuyage avec compresses 5*5cm + PBS 100µL	COMP 3	Isolateur – Flacon	
	COMP 4	Isolateur – Conditionnement finale : seringue	
	COMP 5	Isolateur - Gant	
	COMP 6	Isolateur - Paillasse	
	COMP 7	Isolateur –Vitre isolateur	
	COMP 8	Isolateur – Sachet de la préparation finie avant sortie de l'isolateur	
	COMP +	Isolateur – Test positif (0.1ml de produit déposé directement sur la compresse)	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon Cotton + PPS 100µL	COT 3	Isolateur – Flacon	
	COT 4	Isolateur – Conditionnement finale : seringue	
	COT 5	Isolateur - Gant	
	COT 6	Isolateur - Paillasse	
	COT 7	Isolateur –Vitre isolateur	
	COT 8	Isolateur – Sachet de la préparation finie avant sortie de l'isolateur	
	COT +	Isolateur – Test positif (0.1ml de produit déposé directement sur l'écouvillon)	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon Polyester + PPS 100µL	POL 3	Isolateur – Flacon	
	POL 4	Isolateur – Conditionnement finale : seringue	
	POL 5	Isolateur - Gant	
	POL 6	Isolateur - Paillasse	
	POL 7	Isolateur –Vitre isolateur	
	POL 8	Isolateur – Sachet de la préparation finie avant sortie de l'isolateur	
	POL +	Isolateur – Test positif (0.1ml de produit déposé directement sur l'écouvillon)	

 Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille <b>Pôle S3P</b> Institut de pharmacie	<b>FICHE D'ENREGISTREMENT</b> <b>UNITÉ DE PRÉPARATION CENTRALISÉE DES CYTOTOXIQUES</b>
	<b>PLAN DE PRELEVEMENTS VIROLOGIQUE DE</b> <b>SURFACE DE L'UPCC ET ANALYSE A L'INSTITUT</b> <b>PASTEUR</b>

**PARTIE III : PRELEVEMENT EN ZONE AQ**


**Date et heure de prélèvement** : 25/06/20 à 13h05

**Préleveurs** : MP

Type de prélèvement	Description / Localisation		Commentaires UPCC ET IP
10cm <sup>2</sup> Essuyage avec <u>compresses</u> 2.5*2.5cm + PPS 100µL	COMP 9	Sachet de la préparation	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon <u>Cotton</u> + PPS 100µL	COT 9	Sachet de la préparation	
10cm <sup>2</sup> Essuyage écouvillon <u>Polyester</u> + PPS 100µL	POL 9	Sachet de la préparation	

**Eventuels incidents techniques à signaler** : Non



 Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille <b>Pôle S3P</b> Institut de pharmacie	<b>FICHE D'ENREGISTREMENT</b> <b>UNITÉ DE PRÉPARATION CENTRALISÉE DES CYTOTOXIQUES</b>	
	<b>PLAN DE PRELEVEMENTS VIROLOGIQUE DE</b> <b>SURFACE DE L'UPCC ET ANALYSE A L'INSTITUT</b> <b>PASTEUR</b>	

**PARTIE IV : TEST PROVOQUE ET NEGATIF DANS L'ISOLATEUR**

**Date et heure de prélèvement :** 15/07/20 17h      **Préleveurs :** AD

Type de prélèvement	Description / Localisation		Commentaires UPCC ET IP
<b>10cm<sup>2</sup></b> <b>Essuyage</b> <b>avec</b> <b>compresse</b> <b>2.5*2.5cm +</b> <b>PPS 100µL</b>	<b>COMP -</b>	Témoin négatif en isolateur	
	<b>PCOMP</b>	Contamination provoquée sur pailleasse : 20 µL de produit pur déposé, 5 min d'attente et prélèvement	
<b>10cm<sup>2</sup></b> <b>Essuyage</b> <b>écouvillon</b> <b>Cotton +</b> <b>PPS 100µL</b>	<b>COT -</b>	Témoin négatif en isolateur	
	<b>PCOT</b>	Contamination provoquée sur pailleasse : 20 µL de produit pur déposé, 5 min d'attente et prélèvement	
<b>10cm<sup>2</sup></b> <b>Essuyage</b> <b>écouvillon</b> <b>Polyester +</b> <b>PPS 100µL</b>	<b>POL -</b>	Témoin négatif en isolateur	
	<b>PPOL</b>	Contamination provoquée sur pailleasse : 20 µL de produit pur déposé, 5 min d'attente et prélèvement	

## ANNEXE 2: Protocole du kit d'extraction tiré du QIAamp® DNA Mini and

### Blood Mini Handbook. Disponible sur

<https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>

## Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see "Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)" on page 29.

### Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 17).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 18) is recommended if a higher yield is required.

### Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 16.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

### Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.
2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5 x 10<sup>6</sup> lymphocytes in 200 µl PBS.

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS.

QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

**Note:** It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

**3. Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

If the sample volume is larger than 200 µl, increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer AL proportionally; for example, a 400 µl sample will require 40 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 µl Buffer AL. If sample volumes larger than 400 µl are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

**Note:** Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

**4. Incubate at 56°C for 10 min.**

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

**5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**

**6. Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.**

If the sample volume is greater than 200 µl, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 µl sample will require 400 µl of ethanol.

**7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.\***

Close each spin column to avoid aerosol formation during centrifugation.

Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

**Note:** When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

**8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.\***

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 µl.

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

9. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000  $\times$   $g$ ; 14,000 rpm) for 3 min.
10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200  $\mu$ l Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000  $\times$   $g$  (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

A second elution step with a further 200  $\mu$ l Buffer AE will increase yields by up to 15%.

Volumes of more than 200  $\mu$ l should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation.

Elution with volumes of less than 200  $\mu$ l increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 25). For samples containing less than 1  $\mu$ g of DNA, elution in 50  $\mu$ l Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2  $\times$  100  $\mu$ l instead of 1  $\times$  200  $\mu$ l does not increase elution efficiency.

For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –30 to –15°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

A 200  $\mu$ l sample of whole human blood (approximately  $5 \times 10^6$  leukocytes/ml) typically yields 6  $\mu$ g of DNA in 200  $\mu$ l water (30 ng/ $\mu$ l) with an  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to pages 24–25 and Appendix A, page 50.

# ANNEXE 3: Protocole du kit de PCR Adenovirus r-GENE® Biomérieux

89-010CE\_EN\_v2\_bMx\_120313120313

EN



## 11. Detection and Real-time quantification protocol

*Note:* With a view to simplify the protocol, the device dedicated to holding the amplification reaction mix is referred to as a "tube".

**WARNING:** The performances described have been validated and are guaranteed using the technical extraction/amplification unit combinations recommended in the technical information sheet. To monitor evolution of a patient's viral load test after test, it is vital for the successive sample analyses to take place using strictly the same protocol and with the same combinations of extraction/amplification units.

- To determine the number of tubes, check if the experiment requires the creation of a standard curve (see section "The quantification standard (QS3)").
- Schedule:

- 1 tube per tested sample;
- 1 or 4 tube(s) for Adenovirus quantification standard curve imported/created
- 1 tube for QS3 as positive control in the event of qualitative detection
- 1 tube for adenovirus sensitivity control (SC)
- 1 tube for reference extraction + inhibition control (IC2W0) also used as negative control for extraction and amplification.

**Note:**

- Use the transparent plates (ref.: HSP9601) with the optical stoppers (ref.: TCS0803) for the Dx Real-Time System amplification device).
- When UNG is used, please refer to the protocols and programs described in the technical document of the product 65-001.

### 11.1. Program :

- Regardless which real time PCR platform is used the amplification program remains the same. The amplification program is described in the table below.

**WARNING :** On Stratagene, Agilent or Versant® kPCR Molecular system AD, parameter to 20 sec. the denaturation step.

Steps	Time	Temperature	Cycles	Fluorescence acquisition:						
				LC1	LC2, LC480	Applied Biosystems®	Rotor-Gene®	SC2	Stratagene, Agilent or Versant® kPCR Molecular System AD	Dx Real-Time System
Taq Polymerase Activation	15 min.	95°C	1	-	-	-	-	-	-	-
Amplification	Denaturation	95°C	45	-	-	-	-	-	-	-
	Hybridization Elongation			40 sec.	60°C	630	630 660	FAM VIC	Green Yellow	FAM Cy3
End of the elongation										

**Note 1:** Temperature transition rate/slope is pre-set at 20°C/sec or 100%.

**Note 2:** On LightCycler® instruments, add a cooling step : 30 sec / 40°C / 1 cycle at the end of the PCR.

**Note 3:** On LightCycler®, adjust the « SEEK TEMPERATURE » parameter to 60°C during programming.

**Note 4:** On the LightCycler® 2, it is ESSENTIAL to use a colour compensation file to interpret the results. Make sure that this is still valid (see appropriate technical information sheet) and has been created and recorded in the LightCycler® 2.0 management software, using the r-gene® Colour Compensation reagent (ref.:71-103)

**Note 5:** On LightCycler® 480, there are two optical systems: only "System II" is compatible with the Adenovirus R-gene® kit. "System II" includes automatic colour compensation in its software.

**Note 6:** On Applied Biosystems® select « NONE » in « PASSIVE REFERENCE » when programming.

**Note 7:** On Rotor-gene®, calibrate the signal by clicking on "GAIN OPTIMISATION".

**Note 8:** On Stratagene®, Agilent or Versant® kPCR Molecular System AD select "NONE" in "REFERENCE DYE".

Programming and analysis assistance sheets, per device type, downloadable at [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib)

# ARGENE

## 11.2. Amplification preparation

### Amplification room

- Before starting the experiment:
  - The reagents must be fully defrosted to room temperature before testing.
  - Mix each reagent (to a vortex for 2 seconds or through successive pipetting) and centrifuge briefly.
  - Homogenize thawed reagents by vortexing or by pipetting, then briefly centrifuge.
  - Make sure the cooling block was decontaminated by exposure under U.V. light for 30 min.
  - Make sure the cooling block was correctly pre-cooled at +2°C/ +8°C.

**WARNING:**

- In order to keep contamination to a minimum, close the tubes as you go along.
- Replace the amplification premix (R10), quantification standards (QS) and sensitivity test (SC) at -18°C/-22°C immediately after use
- Each premix cannot undergo more than 7 freezing/defrosting cycles.

- Collect 15 µL of the amplification premix (R10) by gently homogenizing with the pipet in order to distribute the same volume in all tubes.

**WARNING :** The order for adding samples/reagents as shown below must be followed :

- Add 10 µL of each extracted sample in the corresponding tubes.
- Add 10 µL of the sensitivity control (SC) in the corresponding tube (see chapter "Controls").
- Add 10 µL of each standard (from QS4 to QS1) in the corresponding tubes (see chapter "Controls").
- Add 10 µL of extracted mix IC2+W0 in the corresponding tube. This tube is the IC2W0 control (see chapter "Controls").
- Centrifuge the tubes with the corresponding device and transfer them to the thermocycler.

## 11.3. Running the Adenovirus R-gene<sup>®</sup> program:

- Run the amplification program (stored according to the instructions described in section "Program")
- Designate the samples and controls.
- For Adenovirus quantification enter the following values for the quantification standards in copies/mL or copies/PCR:

	Quantification (whole blood, plasma, CSF, ocular samples, stool, respiratory samples)					
	Extraction 200µL Elution in 50 µL (copies/mL)	Extraction 200µL Elution in 100 µL (copies/mL)	Extraction 300 µL Elution in 150 µL (copies/mL)	Extraction 250 µL Elution in 65 µL (copies/mL)	Extraction 300 µL Elution in 90 µL (copies/mL)	Results in copies/PCR
QS1	1 250 000	2 500 000	2 100 000	1 250 000	1 500 000	50 000
QS2	125 000	250 000	210 000	125 000	150 000	5 000
QS3	12 500	25 000	21 000	12 500	15 000	500
QS4	1 250	2 500	2 100	1 250	1 500	50

# ARGENE

## 12. Data Analysis

Programming and analysis assistance sheets, per device type, downloadable at [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib)

**Note :** 530 nm = the reading channel "FAM" or "Green" or other depending on the real-time PCR platforms. For reasons of simplification, only "530 nm" is used.

560 nm = the reading channel "VIC", "Hex" or other according to the real-time PCR platforms. For reasons of simplification, only "560 nm" is used.

### 12.1. With LightCycler® 1.0:

- Apply the **Fit Points** method in **Arithmetic** mode using 2 data points.
- Move the **threshold line** (red horizontal cursor line) to a position where it crosses the fluorescence curves of all the samples in their linear part, above the baseline noise.

**Note :** If the position of the crossing line is not sufficient for crossing all the sample curves in their linear part, repeat the step as frequently as necessary to obtain the CP for each sample.

- For each sample, a **CP Crossing Point** is calculated at 530 nm.
- To quantify the samples, use the "Second Derivative Maximum" method in **Arithmetic** mode.
- The concentration calculated for Adenovirus appears in the **Calculated** column (**COPIES/mL**).

### 12.2. With LightCycler® 2.0:

- Analysis of the viral target is carried out in the **Absolute Quantification** mode at 530 nm.
- Analysis of the extraction + inhibition control is carried out in the **Absolute Quantification** mode at 560nm after activation of the colour compensation file (**COLOUR COMPENSATION** tab.) (**Colour Compensation r-gene®** ref: 71-103).
- Apply the **Fit Points** method.
- Move the **threshold line** (red horizontal cursor line) to a position where it crosses the fluorescence curves of all the samples in their linear part, above the baseline noise.

**Note :** If the position of the crossing line is not sufficient for crossing all the sample curves in their linear part, repeat the step as frequently as necessary to obtain the CP for each sample.

- For each sample, a **CP Crossing Point** is calculated at 530 nm.
- To quantify the samples, select **Automated F' max** mode (second derivative method).
- The concentration calculated for Adenovirus appears in the **CONC** column (**COPIES/mL**).
- The extraction+inhibition controls are analysed by comparing the calculated CP value for each extraction+ inhibition control (**IC2sample**) to the CP value obtained with the reference extraction + inhibition test (**IC2W0**) at 560 nm.

### 12.3. With LightCycler® 480 (System II):

- Switch on the LC480 (System II) **FAM – HEX** automatic compensation
- The viral target is analysed in **Absolute Quantification** mode at 530nm (**FAM**).
- The extraction + inhibition control is analysed in **Absolute Quantification** mode at 560 nm (**HEX**).
- For each positive sample, a **Crossing Point (CP)** is calculated at 530 nm.
- The extraction+inhibition controls are analysed by comparing the calculated CP value for each extraction + inhibition control (**IC2sample**) to the CP value of the reference extraction + inhibition test (**IC2W0**) at 560 nm.

### 12.4. With SmartCycler® 2.0:

- The viral target is analysed in **FAM** mode at 530 nm.
- The extraction + inhibition test is analysed in **Cy3** mode at 560 nm.
- For each positive sample, a **Crossing Point (CP)** is calculated at 530 nm (**FAM Ct**).
- The extraction + inhibition controls are analysed by comparing the calculated CT value for each extraction + inhibition controls (**IC2sample**) to the CT value of the reference extraction + inhibition test (**IC2W0**) at 560 nm (**Cy3 Ct**).
- The concentration calculated for each sample appears in the **FAM STD/RES GREEN** column.

### 12.5. With Applied Biosystems®:

- Make sure that **NONE** is selected in the **Passive Reference** field because the R10 premix does not contain any passive reference fluorochrome.
- Analysis of the samples is carried out after having selected the **FAM R-GENE** detector in the **Detector** field.
- Adjust the **Manual Baseline** (red horizontal cursor line) manually to a position where it crosses the fluorescence curves of all the samples in their linear part. This step is performed to identify the positive samples which correspond to a calculated CT value. Negative samples are defined as **UNDETERMINED** displayed in the CT column by the SDS software.
- Analysis of the extraction + inhibition controls (**IC2sample** and **IC2W0**) is carried out in the same way after having selected the **VIC R-GENE** detector in the **Detector** field.
- Make sure that **none** is selected in the **Passive Reference** field because the Adenovirus R-gene® premix **R10** does not contain any passive reference fluorochrome.
- To quantify the samples, return to linear mode.
- The concentration calculated for Adenovirus appears in the report drafted and printed at the end of each experiment.
- The extraction+inhibition controls are analysed by comparing the calculated CT value for each extraction + inhibition control (**IC2sample**) to the CT value of the reference extraction + inhibition test (**IC2W0**) at 560 nm.

# ARGENE

## 13. Validation and interpretation of results

**Note:** For samples analyzed as positive, a further identification of the adenovirus subgroup can be carried out with the ADENOVIRUS CONSENSUS kit (ref.: 67-065). In this case, keep an aliquot of the corresponding sample.

### 13.1. Test validation :

**WARNING:** The test is only valid if all following conditions are fulfilled. If this is not the case, all samples and controls must be tested again.

**1<sup>st</sup> CONDITION :** IC2W0 should not give a detectable signal at 530 nm.

**2<sup>nd</sup> CONDITION :** IC2W0 must be equal or lower than 32 cycles at 560 nm.

**3<sup>d</sup> CONDITION :** The QS3 CT of the standard range should be between 29 and 33 cycles

**4<sup>th</sup> CONDITION :** The slope and/or efficiency required for the standard range should be between the values listed in the table below :

QUANTIFICATION Whole blood, plasma, CSF (Stools, BAL and respiratory samples)			QUALITATIVE DETECTION Recommended for stools, BAL, biopsies, nasal samples
Instruments	Valuable Slope/Efficiency		Not applicable
	The standard curve is created with all 4 quantification standards for each experiment.	The standard curve is created with all 4 quantification standards for subsequent experiments.	
LightCycler® 1.0	-3.917 < Slope < -3.103	-3.587 < Slope < -3.208	
LightCycler® 2.0 / LightCycler® 480	1.8 < Efficacy < 2.1	1.9 < Efficacy < 2.05	
SmartCycler® 2.0	-0.322 < Slope < -0.255 -3.917 < Slope* < -3.103	-0.278 < Slope < -0.311 -3.587 < Slope* < -3.208	
Rotor-Gene®	0.8 < Efficacy < 1.1	0.9 < Efficacy < 1.05	
ABI® ABI StepOne®, ABI Faat	-3.917 < Slope < -3.103	Non applicable	
Stratagene®, Agilent or Versant® kPCR	0.8 < Efficacy < 1.1	Non applicable	
Molecular System AD			
Dx Real-Time System	0.8 < E < 1.1	Non applicable	

\* With SmartCycler®, the slope of the regression line  $Ct = f(\text{Log (Concentration)})$  is obtained by right-clicking on the graph and by selecting "TRANSPOSE X AND Y AXES".

=> If all conditions are fulfilled, the results obtained with the samples can be validated.

### 13.2. Sample reading:

- Each sample must be analysed one by one.
- There is a 530 nm CT for all positive samples.
- The absence of CT at 530 nm corresponds to a negative or incorrectly extracted sample.
- However, in all cases, it is necessary to ensure there is no inhibition and that the extraction stage at 560 nm was carried out correctly according to the factors described in paragraph 13.3. "Interpretation of results".



**DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE**

Nom et Prénom de l'étudiant : Dandekar Aje INE : 0903059789C

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 18 / 09 / 2020 à 17 h 00 Amphithéâtre ou salle : Curie

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

Nom : Pirouet


Prénom : Narine

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 18/09/20

Signature: 

Avis du président du jury

Nom : Odou

Prénom : Pascal

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 24/08/2020

Signature: 

Décision du Doyen

Favorable

Défavorable

le 27 août 2020

Le Doyen



B. DÉCAUDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.





Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2019/2020

**Nom : Danckaert**  
**Prénom : Alice**

**Titre de la thèse : Développement d'une méthode de détection de la contamination virale au sein de l'unité de préparation du CHU de Lille suite à un essai clinique de thérapie génique**

**Mots-clés : Contamination virale, médicament de thérapie génique, vecteurs viraux, méthode de détection, prélèvement de surface**

---

**Résumé :**

Les pharmacies hospitalières sont sollicitées, depuis peu, pour prendre en charge des médicaments de thérapie génique. Le Centre Hospitalier de Lille participe à un essai clinique de thérapie génique qui utilise comme vecteur viral un adénovirus génétiquement modifié. Actuellement, nous ne disposons pas de locaux dédiés à ce type de médicament, nous nous sommes donc interrogés sur le risque de contamination virale de nos locaux et de contamination croisée avec les autres préparations. Un circuit pharmaceutique spécifique a été mis en place pour limiter ces risques que nous exposons dans ce travail. Néanmoins, nous n'avons aucun moyen pour évaluer le risque potentiel de contamination virale et l'efficacité des mesures mises en place.

L'objectif de ce travail est de développer une méthode de détection de la contamination virale pour un vecteur de type adénovirus et de tester plusieurs méthodes de prélèvement de nos surfaces de préparation.

Dans ce travail, nous détaillons le choix de la méthode de détection qui s'est porté sur la technique par Polymerase Chain Reaction (PCR) puis le choix de trois méthodes de prélèvements surfaciques à partir d'une revue de la littérature (essuyage à l'aide de compresses et écouvillons). Puis nous analyserons les résultats obtenus et discuterons de la méthode qui nous semble la plus efficace pour détecter l'adénovirus modifié contenu dans notre produit. Nous discuterons également de l'efficacité des mesures de confinement et de nettoyage mises en place pour sécuriser notre circuit.

---

**Membres du jury :**

**Président** : Mr Pascal Odou, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie - Université de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

**Directeur de mémoire** : Mme Marine Pinturaud, Pharmacien – Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

**Assesseur** : Mme Anne Goffard, Médecin, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie - Université de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille - Institut Pasteur de Lille

**Assesseur**: Mr Etienne Brochot, Pharmacien, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier, UFR de pharmacie - Université Picardie Jules Verne, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens