

Les vésicules extracellulaires, nouvelle plateforme thérapeutique biochimique

Résumé EverZom est une société biopharmaceutique spécialisée dans la bioproduction de vésicules extracellulaires ou exosomes, nanoparticules biologiques considérées comme une alternative aux thérapies cellulaires. Spin-off issue du laboratoire Matières et Systèmes Complexes (MSC) de l'Université Paris Cité et du CNRS, elle valorise un procédé pouvant être développé à l'échelle industrielle afin de produire à haut rendement ces vésicules extracellulaires. EverZom a pour ambition de se positionner comme fabricant d'outils biologiques à destination des acteurs industriels développant les thérapies vésiculaires de demain.

Mots-clés Vésicules extracellulaires, exosomes, bioproduction, turbulence, médecine régénérative.



EVERZom

Date de création : 2019

Implantation : Paris

Fondateurs : Jeanne Volatron, Nicolas Rousseau, Max Piffoux, Amanda Brun, Florence Gazeau et Claire Wilhelm

Secteur d'activité : bioproduction

Technologie : production de vésicules extracellulaires grâce à une technologie de turbulence

Ambition : lever le verrou de la bioproduction industrielle de vésicules extracellulaires pour la médecine régénérative

• www.everzom.com

De la connaissance au soin

Les vésicules sont sécrétées par des cellules de manière active et peuvent avoir différentes origines intracellulaires : les exosomes sont sécrétés à l'intérieur d'une vésicule intracellulaire (MVB) puis relargués par les cellules dans le liquide extracellulaire, les microvésicules bourgeonnent directement de la membrane plasmique dans le liquide extracellulaire, tandis que les corps apoptotiques sont issus de la fragmentation de la cellule à la fin d'une mort cellulaire programmée. Une fois mélangés dans le liquide extracellulaire, il est très difficile, pour ne pas dire impossible, de séparer ces sous-types de vésicules, ce qui pousse la communauté scientifique à utiliser le terme général de « vésicules extracellulaires » pour qualifier le mélange de vésicules que l'on purifie.

Les vésicules extracellulaires sont adaptées au transport de molécules entre les cellules, ce qui a poussé de nombreuses équipes à les utiliser comme vecteur pour les médicaments (*figure 2*). L'équipe Biother du laboratoire MSC a ainsi montré qu'il était possible de charger des nanoparticules, des molécules de chimiothérapie ou autres médicaments dans les vésicules, puis de les délivrer de manière plus ciblée chez l'animal dans de nombreux modèles. Ces résultats ont démontré l'intérêt de l'utilisation des VE chargées en chimiothérapie par rapport à des chimiothérapies encapsulées par des liposomes pour le traitement des cancers disséminés dans la cavité péritonéale [3].

Les vésicules sont aussi des « mini-cellules » qui gardent les propriétés de leurs cellules productrices. Ainsi, il a été montré que les vésicules issues de cellules souches (en particulier les cellules souches mésenchymateuses) étaient capables de garder les propriétés thérapeutiques de ces dernières. Dans des modèles d'insuffisance cardiaque ou d'infarctus du myocarde, les VE sont capables d'améliorer la fonction cardiaque de la même manière que les cellules souches mésenchymateuses. Elles favorisent aussi la cicatrisation, par exemple celle des fistules digestives qui sont des communications aberrantes entre le tube digestif et un autre organe ou la peau.

Les effets thérapeutiques des VE en médecine régénérative sont maintenant démontrés chez l'animal dans des centaines d'indications allant du traitement de l'arthrose à l'AVC, en passant par les maladies inflammatoires. Par rapport aux cellules souches, les vésicules sont potentiellement moins à risque de toxicité (comme une différenciation anarchique

Découvertes en 1946 par Erwan Chargaff [1], les vésicules extracellulaires (VE) sont des assemblages macromoléculaires nanométriques sécrétés par les cellules avec une taille comprise entre 50 et 1 000 nanomètres. Beaucoup mieux comprises depuis ces vingt dernières années, leurs propriétés ne cessent de nous étonner. Ces vésicules sont constituées d'une bicouche lipidique ressemblant à de la membrane plasmique de la cellule productrice et contenant une portion du cytosol (liquide intracellulaire) et ses multiples composants (protéines, ARN, métabolites organites...) (*figure 1*). Il faut donc imaginer des objets une centaine de fois plus petits que des cellules, souvent invisibles au microscope optique, et longtemps considérés comme des déchets cellulaires. Leur surface est recouverte de protéines aux multiples fonctions, qui se retrouvent dans tous les fluides biologiques de l'organisme en fortes concentrations (environ 10^{11} à 10^{12} particules/L) pour transporter de l'information d'une cellule à une autre [2].

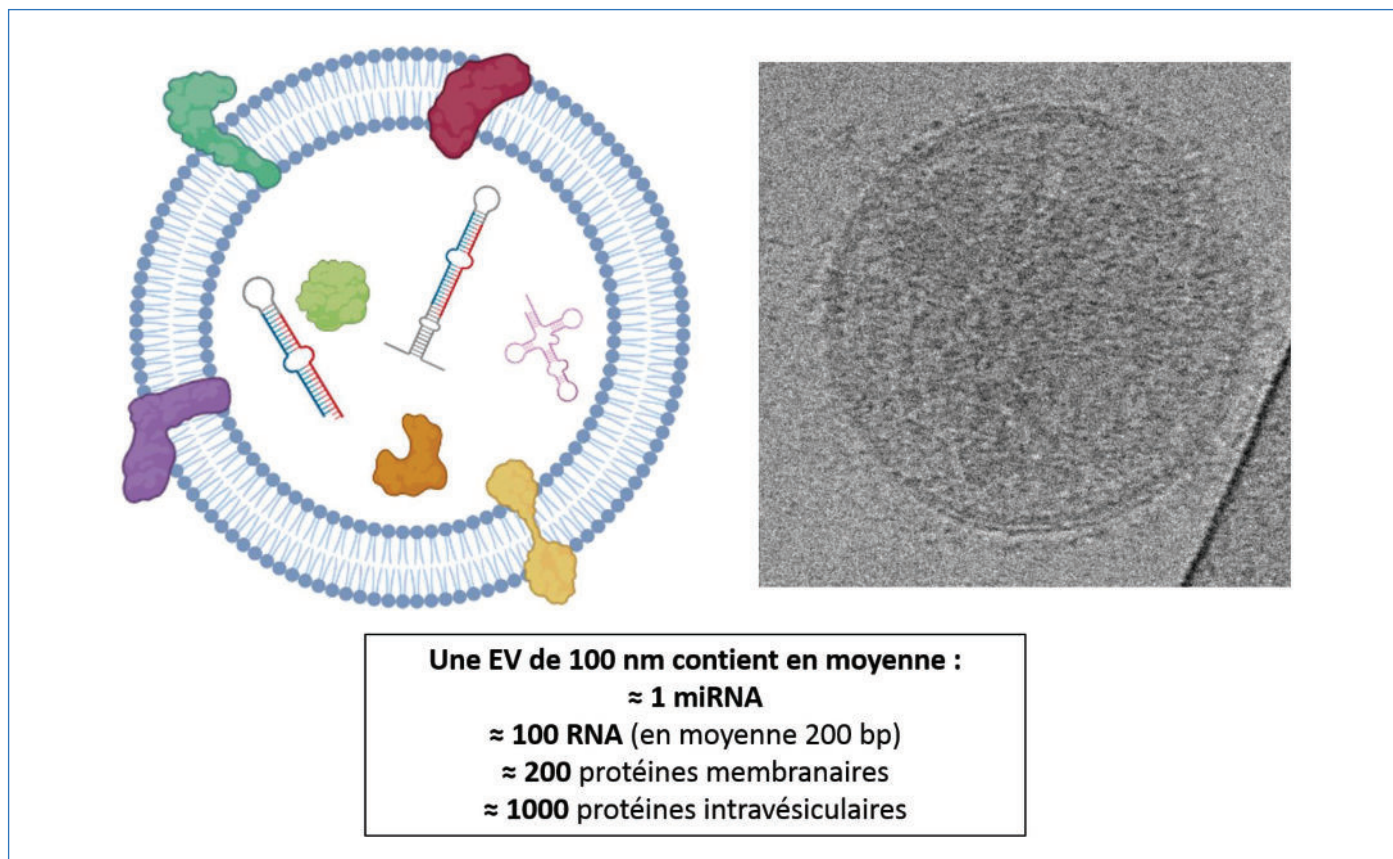


Figure 1 - Structure et contenu des vésicules extracellulaires : schéma représentatif d'une VE et photographie en cryomicroscopie électronique montrant la bicouche lipidique, les protéines membranaires et laissant deviner le contenu intravésiculaire.

ou des embolies pulmonaires), plus simples d'utilisation d'un point de vue logistique (elles peuvent être congelées-décongelées rapidement et simplement), mais laissent surtout envisager la possibilité d'une utilisation dite allogénique, c'est-à-dire avec un seul donneur pour de multiples patients. La production de ce type de traitement engendrerait une baisse des coûts et la potentielle démocratisation de ce type de thérapie.

Les vésicules extracellulaires se positionnent comme une des prochaines évolutions thérapeutiques dans le domaine de la médecine régénérative pour remplacer les cellules souches avec des préparations de vésicules non modifiées. Elles sont déjà en développement clinique dans des indications comme l'infarctus, les névralgies ou la cicatrisation d'ulcères [4]. Mais leur ingénierie en fait aussi des vecteurs de molécules d'intérêt, associés ou non à leurs propriétés endogènes, pour le traitement des cancers principalement, mais aussi dans d'autres pathologies comme l'AVC.

Le secteur industriel des vésicules extracellulaires est encore limité quoiqu'en pleine expansion, avec plus de 500 millions de dollars déjà investis sur une centaine d'entreprises mondiales du domaine. En effet, le premier essai clinique utilisant des VE date de 2005 pour la vaccination, en France, de patients atteints de mélanome métastatique [5]. En 2021, seuls quatre essais avaient été complétés à l'échelle mondiale, dix-sept autres étant en cours [4].

Les principales difficultés au développement rapide des thérapies vésiculaires sont communes à beaucoup de nouvelles familles thérapeutiques : une mauvaise compréhension de leur mécanisme d'action et un procédé de production peu transférable en clinique. En effet, l'hétérogénéité des VE rend compliqué le décryptage de leur mécanisme d'action à

l'échelle biomoléculaire. Leur procédé de production se limite aujourd'hui en majorité à de la production à petite échelle et non conforme aux réglementations de la recherche clinique. Enfin, leur regroupement *a priori* avec la famille des médicaments biologiques, comme les protéines recombinantes, masque une différence importante : les vésicules sont un ensemble d'unités hétérogènes contenant un grand nombre de biomolécules très variées, ce qui complexifie leur caractérisation fine (au même titre qu'une formulation contenant un seul type de protéine par exemple) avec les outils disponibles. Il existe un manque de technologies matures capables de caractériser le contenu d'une vésicule unique, de distinguer les grandes sous-populations de vésicules, ou de déterminer précisément la dose contenue dans une préparation.

Tour d'horizon de quelques grandes entreprises de l'ingénierie des vésicules

Ce tour permet d'approcher la complexité des développements actuels, notamment en vectorisation. L'entreprise la plus avancée est Codiak Biosciences, fondée en 2015. Celle-ci développe un large éventail de médicaments vésiculaires, avec des indications en oncologie, neurologie et pour le développement de vaccins.

Dans le domaine de la thérapie génique, Anjarium Bioscience développe la technologie des hybridosomes (brevet US20160354313A1). Les hybridosomes sont des vecteurs constitués par rassemblement de deux entités : une vésicule extracellulaire qui apporte ses propriétés de biocompatibilité et de ciblage thérapeutique, et une nanoparticule lipidique synthétique. Cette dernière peut être plus facilement chargée en principe actif que les VE et a des propriétés fusogéniques,

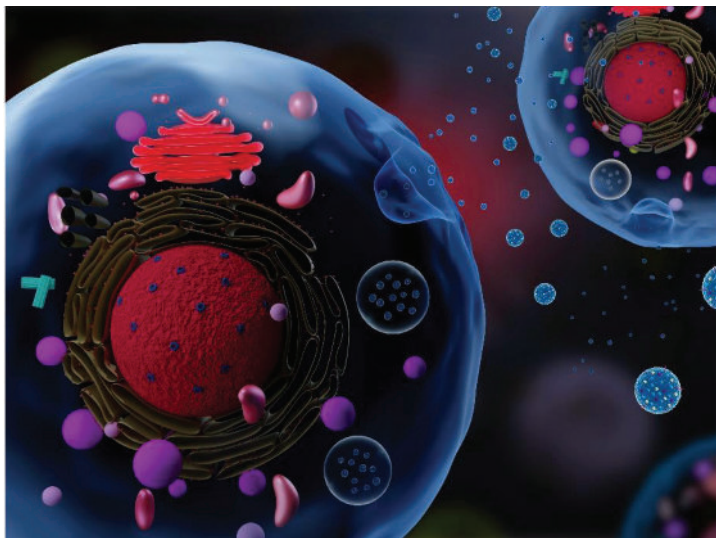


Figure 2 - Les vésicules extracellulaires, médiateurs de la communication intercellulaire.

c'est-à-dire capables de promouvoir la fusion avec liposome/VE au cours du procédé de production. Encore au stade de développement préclinique, aucune indication thérapeutique précise n'a encore été dévoilée.

Enfin, un troisième grand acteur est la société Evox Therapeutics, spin-off de l'Université d'Oxford et de l'Institut Karolinska, qui développe des médicaments essentiellement pour des maladies orphelines sans traitement, comme l'acidurie argininosuccinique, ou la maladie de Niemann-Pick type C, en partenariat avec une big pharma établie (Takeda) mais n'est pour l'instant qu'au stade préclinique. Sa plateforme technologique nommée DeliverEX™ s'appuie sur une multitude de brevets protégeant des techniques d'ingénierie des acides nucléiques et des protéines, notamment des biomolécules de fusion entre des protéines ancrées à la membrane des VE, différentes de celles de Codiak, et des molécules soit thérapeutiques, comme des récepteurs-leurre (brevet EP2983721A2) ou des acides nucléiques codants ou régulateurs (brevet EP18806990NWB1), soit permettant la vectorisation et la pénétration des VE dans les cellules-cibles, comme par exemple des peptides de pénétration cellulaire de nouvelle génération (brevet WO2021/099621 A1).

Un grand nombre d'entreprises s'intéressent également à l'utilisation de VE natives, notamment celles dérivées de cellules souches, pour remplacer les thérapies cellulaires régénératives. On remarque cependant que les trois entreprises précédentes développent chacune avec un procédé distinct des VE modifiées, contenant des molécules exogènes indispensables à leur activité thérapeutique. La plupart des grands acteurs du domaine mettent en avant la nécessité de capacité de production interne, répondant aux normes de la recherche clinique GMP/BPF. Le défi commun à la diffusion clinique des VE reste celui d'une production à une échelle industrielle, avec des quantités permettant de fournir des essais cliniques puis un nombre conséquent de patients de manière reproductible. Quelques sociétés de production (CMO) cherchent également à offrir leurs services dans ce domaine. Parmi ces dernières, la société EVerZom se démarque par son processus de production innovant.

La méthode de production la plus répandue consiste à cultiver une monocouche de cellules et de prélever le milieu de culture afin d'isoler les vésicules extracellulaires libérées par les cellules ($\approx 4\ 000$ EV par hASC en 72 h). Entre 3 millions

et 240 millions de cellules-souches mésenchymateuses doivent être administrées chez le gros animal pour avoir un effet thérapeutique efficace. Les conditions actuelles de culture font que cette méthode est difficilement envisageable pour une industrialisation de la production des VE. Pour débloquer ce verrou technique, il faut par exemple optimiser le nombre total de vésicules produites en augmentant le nombre de cellules productrices.

Plusieurs stratégies permettant d'augmenter le nombre de VE sécrétées par cellules ont été proposées. Le procédé adopté par EVerZom repose sur la culture cellulaire sur des microporteurs offrant un ratio surface/volume avantageux conjugué à une stimulation mécanique qui induit un relargage massif de VE [6].

Il faut alors s'assurer que les VE sont compatibles avec une utilisation chez l'homme, puisque la production à grande échelle de VE peut modifier la pureté, la stabilité ou l'effet thérapeutique [7]

L'ambition d'EVerZom

En collaboration avec le laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université de Paris (UMR 7057), EVerZom a développé une technologie unique pour surmonter ces obstacles. Ce procédé adaptable à grande échelle stimule la libération de VE en exerçant une stimulation hydromécanique contrôlée sur les cellules lors de leur culture tridimensionnelle dans un écoulement turbulent. Le rendement est de l'ordre de dix fois plus de vésicules en dix fois moins de temps, ce qui constitue le point fort d'EVerZom [8].

Dans un premier temps, les cellules adhérentes, comme des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh), sont cultivées sur des microporteurs. Ces billes de polymère de 200 μm bénéficient d'un rapport surface/volume élevé ; quelques grammes de ces billes peuvent correspondre à la surface de dizaines de flasques de culture cellulaire. Cette approche permet également de réduire les coûts globaux associés tels que le volume de milieu utilisé, les consommables – particulièrement ceux en plastiques difficiles à recycler – et le temps de manipulation. Les cellules ancrées sur les microporteurs sont contenues dans des « spinner flasks » ou des bioréacteurs qui peuvent être considérés basiquement comme des bouteilles de milieux de culture agitées par une hélice centrale.

Pendant la phase d'ensemencement des cellules, le volume de travail est réduit de manière à augmenter la probabilité de rencontre des cellules avec leur support 3D. De plus, une agitation faible et intermittente est appliquée, permettant aux cellules d'avoir un temps suffisant pour s'ancrer et que tous les microporteurs soient colonisés de manière homogène. Par la suite, pendant la phase de prolifération cellulaire, une agitation faible continue homogénéise le milieu et maintient les microporteurs en suspension, le milieu de culture fournissant les nutriments essentiels aux cellules étant changé régulièrement en fonction de l'activité métabolique de ces dernières. Lorsque la confluence (nombre de cellules rapporté à une surface donnée) souhaitée est atteinte sur les microporteurs (moins d'une semaine), une libération massive de VE (quelques heures) est déclenchée avec une stimulation hydromécanique précise dans un milieu sans sérum. Pour ce faire, les micro-tourbillons adéquats qui stimulent les cellules par l'équation de Kolmogorov sont calculés en tenant compte de paramètres tels que la géométrie du système,

la viscosité cinématique et la vitesse de rotation des pales. La puissance dissipée volumique augmente ainsi, la longueur de Kolmogorov diminue et la contrainte appliquée sur les cellules augmente. La gamme de stimulation mécanique susceptible d'induire la production de VE sans porter atteinte à la survie cellulaire a été explorée, ce qui a permis de sélectionner une longueur de Kolmogorov pour obtenir une contrainte mécanique optimale avec un bon compromis efficacité de production/viabilité cellulaire. Tout au long du protocole de « vésiculation », en plus de la viabilité cellulaire, la quantité et la taille des VE libérées sont suivies. Les vésicules générées par la turbulence conservent les propriétés de leurs cellules parentales et sont collectées en fin de processus, puis soumises à une purification et enfin analysées.

Amener ces découvertes jusqu'au traitement des patients

L'équipe BioTher du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (Université de Paris, CNRS) travaille sur les VE depuis plus de dix ans. Elle a été pionnière dans le développement de méthodes d'encapsulation d'agents thérapeutiques dans des VE afin de concevoir des agents biocompatibles combinant des fonctionnalités de thérapie et de diagnostic uniques. Au cours de ces travaux, l'équipe a réalisé qu'il y avait un besoin industriel d'une production standardisée et à grande échelle de VE. C'est ainsi qu'elle a initié des recherches sur le développement de nouvelles méthodes de production. Une première preuve de concept de système de production a été réalisée sur des puces microfluidiques composées de canaux.

La technologie de turbulence développée par la suite possède l'avantage de s'implémenter directement dans des bioréacteurs, ce qui facilite l'augmentation en échelle. Les premiers tests dans des systèmes de spinner flask d'un volume de 100 mL ont permis d'identifier la longueur de Kolmogorov comme paramètre clé gouvernant la vésiculation. La production a ensuite été validée dans des systèmes de volume de 1L et exemplifiée sur plusieurs types cellulaires. À la suite de ces premiers travaux, un premier brevet a été déposé en juin 2017 par l'Université de Paris, le CNRS et le Genethon.

Trois mois avant le dépôt de ce premier brevet, l'idée d'aventure entrepreneuriale émergeait, suite à la participation de Jeanne Volatron au séminaire « Valorisation de la recherche par la création d'entreprise », organisée par le C'Nano. Quelques semaines après le séminaire, les contours d'une équipe co-fondatrice se dessinaient, les chercheurs ayant inventé et développé la technologie – Amanda Brun, Max Piffoux, Florence Gazeau, Claire Wilhelm et Jeanne Volatron – voulant prendre en charge l'aspect opérationnel de la création d'entreprise. Une phase d'apprentissage et de découverte du milieu entrepreneurial commença alors, avec en particulier la formation Centrale Entrepreneur suivie par Jeanne Volatron à partir de septembre 2017. C'est sur ces bancs qu'elle rencontra son futur associé, Nicolas Rousseau, centralien avec une expertise en biotechnologie. C'est à travers différentes mises en situation telles que faire un « business plan » ou réaliser une étude de marché lors de la formation Centrale Entrepreneur, que nous nous sommes rendus compte que les profils PhD et ingénieur étaient extrêmement complémentaires. Nicolas Rousseau rejoignit l'équipe opérationnelle en septembre 2018. Étant tous les deux primo-entrepreneurs, nous avons décidé de suivre

plusieurs séminaires et formations au milieu entrepreneurial, dont DeepTech Founders et HEC Challenge Plus, qui abordent les différentes dimensions de la création d'entreprise (juridique, propriété intellectuelle, recrutement, financement, modèle d'affaire).

En parallèle, nous nous sommes efforcés à construire un environnement favorable à la création d'EVERZOM en termes d'accompagnement, de propriété intellectuelle et de financement. À partir de 2019, nous sommes installés dans l'incubateur Paris Biotech Santé et accompagnés également par l'accélérateur Wilco, qui nous a accordé un prêt d'honneur. En juillet 2019, nous sommes lauréats du concours national Ilab, et la même année, nous entamons des discussions avec Erganeo (anciennement SATT IDF Innov), mandataire des brevets protégeant la technologie de turbulence, pour une licence exclusive d'exploitation de la famille de brevets, qui est signée en décembre 2019.

L'aventure partenariale

En septembre 2019, EVERZOM est créée et embauche son premier employé, Julien Branchu, en octobre 2019. Aujourd'hui, l'équipe compte quatorze personnes, dont cinq jeunes docteurs, une doctorante, quatre ingénieurs, une assistante ingénieure, deux stagiaires et une aide administrative à temps partiel.

Le modèle d'affaires s'exerce par du service (production à la demande de lots de VE, caractérisation), ainsi que la mise en place de programmes de co-développement de candidats médicaments avec d'autres partenaires pharmaceutiques et de programmes propriétaires internes. La société commercialise d'ores et déjà ses services de bioproduction pour différentes biotechs européennes, notamment pour les traitements vésiculaires de fistules digestives des patients atteints de maladies auto-immunes comme la maladie de Crohn ou chez les patients ayant subi des chirurgies bariatriques.

Formation à la propriété intellectuelle, à l'entrepreneuriat, financement et accompagnement personnalisé font encore partie à ce jour de nos besoins.

[1] E. Chargaff, R. West, The biological significance of the thromboplastic protein of blood, *J. Biol. Chem.*, **1946**, 166, p. 189-197.

[2] N. Arraud *et al.*, Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration, *Thromb. Haemost.*, **2014**, 12, p. 614-627.

[3] A. Pinto *et al.*, Immune reprogramming precision photodynamic therapy of peritoneal metastasis by scalable stem-cell-derived extracellular vesicles, *ACS Nano*, **2021**, 15, p. 3251-63.

[4] S. Aka *et al.*, Development of extracellular vesicle-based medicinal products: a position paper of the group "Extracellular Vesicle translation to clinical perspectives - EVOLVE France", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2021**, 179, 114001.

[5] B. Escudier *et al.*, Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.*, **2005**, 3(1), 10.

[6] M. Piffoux *et al.*, Extracellular vesicle production loaded with nanoparticles and drugs in a trade-off between loading, yield and purity: towards a personalized drug delivery system, *Adv. Biosyst.*, **2017**, 1(5), e1700044; M. Piffoux *et al.*, Extracellular vesicles for personalized medicine: the input of physically triggered production, loading and theranostic properties, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2019**, 1, p. 247-258.

[7] I.L. Colao, R. Corteling, D. Bracewell, I. Wall, Manufacturing exosomes: a promising therapeutic platform, *Trends Mol. Med.*, **2018**, 24, p. 242-256.

[8] A. Grangier *et al.*, Technological advances towards extracellular vesicles mass production, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2021**, 176, 113843.

Jeanne VOLATRON*, co-fondatrice et CEO, **Max PIFFOUX**, co-fondateur et CTO, **Julien BRANCHU**, responsable R&D, et **Thibaut FOURNIOLS**, chef de projet, EVERZOM.

* jeanne.volatron@everzom.com