

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2022

THESE 2022/TOU3/2022

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

GAHBICHE Inès

L'ARN messenger, une épopée salvatrice

Date de soutenance

19 Mai 2022

Directrice de thèse : Pr. COUDERC Bettina

JURY

Présidente :	Dr. CHAPUY-REGAUD Sabine
1 ^{er} assesseur :	Pr. COUDERC Bettina
2 ^{ème} assesseur :	Dr. COLACIOS Céline
3 ^{ème} assesseur :	Dr. MONFERRAN Sylvie
4 ^{ème} assesseur :	Dr. TREHEL Camille

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATToux K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

Remerciements

Aux membres du jury,

Madame Sabine CHAPUY-REGAUD,

Merci de me faire l'honneur de présider le jury pour l'évaluation de ma thèse. Vous avez mon entière reconnaissance.

Madame Bettina COUDERC,

Merci d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. C'est un honneur de traiter un tel sujet sous votre direction. Au nom de tous les étudiants de pharmacie de Toulouse merci de nous avoir initiés à la génétique de la meilleure des manières et d'avoir éveillé notre intérêt pour celle-ci.

Je vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils qui m'ont guidée dans le choix de ce sujet. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude.

Madame Céline COLACIOS, Madame Sophie MONFERRAN, Madame Camille TREHEL,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. J'espère que le sujet saura susciter votre intérêt et que son traitement sera à la hauteur de vos attentes.

A tous les professeurs de la faculté de pharmacie de Toulouse,

Je tiens à vous remercier pour la qualité des cours dispensés et pour toutes les connaissances transmises au cours de ces années d'études.

A mes parents,

Merci pour votre soutien sans faille tout au long de ma vie. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir financé mes études et bien plus encore. Merci de toujours m'encourager à aller de l'avant et à croire en mes rêves.

A mes grands-parents,

Merci pour votre soutien inconditionnel et votre bienveillance depuis le début de mes études. Vous êtes un maillon essentiel de ma vie.

A tous les membres de ma famille,

Mon frère, mes oncles, mes tantes, mes cousins, mes cousines, merci de faire partie de ma vie et de contribuer chacun à la personne que je suis.

A mes amies pour la vie,

Chayma, Hela, Imen, Jnina, merci pour votre amitié inestimable. Plus d'une décennie que vous m'accompagnez dans le meilleur comme dans le pire, j'espère qu'on partagera encore toutes les décennies que nos vies connaîtront. Fière qu'on ait toutes évolué ensemble de la meilleure des façons et fière de nous voir avancer vers la réalisation de nos rêves à pas sûrs.

Aux Milli,

Marie, Inès, Laetitia, Lucie, mes pharmaciennes préférées, je suis si heureuse de vous avoir eu à mes côtés tout au long de ces années d'études. Merci pour les innombrables moments partagés, nos soirées pharma, nos soirées potins, nos fous rires, nos week-ends en dehors de Toulouse et la liste est longue.... Merci de m'avoir si bien accueillie et de m'avoir initiée à la french way of life. Notre amitié et nos aventures ne s'arrêteront certainement pas là, le meilleur reste encore à venir.

A ma famille de France la famille CALMET,

Dr. Gérard, Assia, Géraldine, Evelyne, Emma, merci de m'avoir accueillie à bras ouverts dans votre famille et de m'avoir comptée parmi vous pendant les fêtes et toutes les autres occasions de réunions familiales. C'était un plaisir de partager ces moments avec vous.

Je ne vous remercierai jamais assez pour la bienveillance que vous m'avez témoignée durant toutes ces années.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	11
Liste des annexes	12
Résumé :	13
Introduction	14
Partie 1 : Les ARN messagers Transcrits In Vitro « ARNm IVT »	16
I- L'ARN messager, un intermédiaire clé dans l'expression du génome	16
1- Les différents types d'ARN	16
a- ARN codants	16
b- ARN non codants	16
2- Structure de l'ARNm	18
3- Place de l'ARNm dans l'expression des gènes	20
II- Les types d'ARNm obtenus par transcription <i>in vitro</i>	21
1- ARNm non-amplificateur	21
2- ARNm auto-amplificateur	22
3- ARNm trans-amplificateur	23
III- La transfection des ARNm IVT dans les cellules cibles et les tissus cibles	24
1- Les méthodes physiques de transfert des ARNm IVT	26
a- Micro-injection :	26
b- Injection à aiguille :	26
c- Injection à jet :	26
d- Gene Gun :	27
e- Electroporation :	27
f- Sonoporation :	28
g- Transfert Hydrodynamique :	28
h- Massage mécanique :	28
2- Les méthodes chimiques de transfert des ARNm IVT	29
a- Système de transfert basé sur des véhicules lipidiques	29
b- Système de transfert basé sur des véhicules polymériques	32
c- Système de transfert basé sur des véhicules Protéiques	33
d- Système de transfert basé sur des véhicules hybrides	35
3- Les stratégies de transfection	35

4-	Les sites d'administration des ARNm IVT <i>in Vivo</i>	36
a-	Voie intra-veineuse	36
b-	Voie topique	37
c-	Voie sous-cutanée et voie intra-musculaire.....	37
d-	Voie intrathécale	37
e-	Voie intra-nodale.....	38
f-	Voie intra-tumorale.....	38
IV-	Elimination des ARNm IVT dans les cellules.....	38
1-	Mécanismes de dégradation de l'ARNm <i>in Vivo</i>	39
a-	Déadénylation	39
b-	Décapping.....	40
c-	Action des ribonucléases.....	40
2-	Immunogénicité des ARNm IVT.....	40
a-	RLRs	41
b-	TLRs.....	41
c-	Autres ARNdb-binding protéines	42
3-	Optimisation de la stabilité et de la traduction des ARNm IVT.....	43
a-	Optimisation de la structure de l'ARNm	43
b-	Optimisation de l'administration	49
V-	Processus de fabrication des ARNm IVT.....	51
1-	Synthèse de l'ARNm	51
2-	Purification de l'ARNm	52
3-	Optimisation de la fabrication.....	53
	Partie 2 : Applications des ARNm IVT en prévention et en thérapie	56
I-	Les vaccins à ARNm	56
1-	Domaines d'application.....	57
a-	Infectiologie.....	57
b-	Cancérologie.....	58
c-	Allergologie.....	59
2-	Méthodes d'immunisation	60
a-	Injection de cellules dendritiques transfectées <i>ex vivo</i>	60
b-	Injection directe d'ARNm IVT <i>in vivo</i>	61
3-	Réponse immunitaire aux protéines codées par l'ARNm IVT	61
4-	Vaccins ARNm et adjuvants.....	62
a-	Pouvoir adjuvant de l'ARNm	62
b-	Vaccins ARNm avec adjuvants.....	63

5-	Limites des vaccins à ARNm IVT	65
6-	Applications cliniques.....	65
a-	En infectiologie.....	65
b-	En cancérologie	67
c-	En allergologie	68
II-	Immunothérapie passive à ARNm IVT.....	69
1-	Thérapie adoptive par Lymphocytes T et NK	69
2-	ARNm IVT codant pour des anticorps spécifiques	71
3-	Applications cliniques.....	72
III-	Les thérapies de remplacement des protéines par ARNm.....	74
1-	Intérêt des thérapies de remplacement par ARNm	74
2-	Limites des thérapies de remplacement par ARNm.....	75
3-	Applications cliniques.....	76
IV-	Edition du génome	78
1-	Principe de l'édition du génome	78
2-	Les nucléases éditrices de génome	78
3-	Méthodes de mise à disposition des nucléases dans les cellules	80
4-	Avantages de la mise à disposition des nucléases par ARNm IVT.....	80
5-	Applications cliniques.....	81
V-	Reprogrammation des cellules IPS.....	82
1-	Les types de cellules souches	82
a-	Les cellules totipotentes.....	83
b-	Les cellules pluripotentes	83
c-	Les cellules multipotentes.....	83
d-	Les cellules oligopotentes	84
e-	Les cellules unipotentes	84
2-	Les sources de cellules souches	84
a-	Les cellules souches embryonnaires	84
b-	Les cellules souches adultes.....	84
c-	Les cellules souches pluripotentes induites	85
3-	Les cellules IPS.....	85
a-	Obtention des cellules IPS.....	85
b-	Intérêt des cellules IPS	86
4-	Utilisation des ARNm IVT dans la reprogrammation des cellules iPS	87
5-	Applications précliniques et cliniques.....	89
	Conclusion	91

Bibliographie :	102
Abstract	108

Liste des abréviations

AcM : Anticorps monoclonal

ADCC : Antibody dependant cellular toxicity

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acides Désoxyribonucléique codant

ADNsb : Acide ribonucléotidique simple brin

AES : Amino-terminal Enhancer of Split

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ApoE: Apolipoprotéine E

ARCA : Anti-Reverse Cap Analog

ARE : AU rich elements

ARNdb : Acide ribonucléotidique double brins

ARNlnc : Acide ribonucléique long non-codant

ARNm IVT : Acide ribonucléique messenger transcrit *in vitro*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNmi : Acide ribonucléique micro

ARNpi : Acide ribonucléique interagissant avec Piwi

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNsi : Petit acide ribonucléique interférent (small interfering)

ARNsn: Petit acide ribonucléique nucléaire (small nuclear)

ARNsno: Petit acide ribonucléique nucléolaire (small nucleolar)

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

BiTE: Bispecific T-cell Engager

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CAF1 : Chromatin assembly factor 1t

CAR: Chimeric Antigenic Receptor

CARD: Caspase activation and recruitment domain

Cas9 : Caspase 9

CCR4 : Carbon Catabolite Répression 4

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CNOT/ CCR4-NOT: Carbon Catabolite Repression- Negative On TATA

COVID-19: Coronavirus disease 2019

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CPE : Cytoplasmic polyadenylation element

CPEB: Cytoplasmic polyadenylation element binding protein

CRISPR: Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats

CTD : Carboxy-Terminal Domain

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

DC: Dendritic cell

DCP: Decapping protein

DCPS: Scavenger Decapping protein

DOE: Design of experiment

DT2 : Diabète de type 2

FDA: Food and Drug administration

GVHD: Graft Versus Host Disease

HLA: Human Leucocyte Antigen

HPLC: High performance liquid chromatography

I.M : Intra-musculaire

I.V: Intra-veineux

IFN : Interféron

Ig: Immunoglobuline

iPSC: induced pluripotent stem cells

IRAK: Interleukin receptor- associated kinase

IRE: Iron response element

IRES: Internal ribosome entry site

IRF3: Interferon regulatory factor

LNP: Lipid nanoparticle

MDA5: Melanoma differentiation associated protein 5

MDDC: Monocyte-derived dendritic cells

MN: Méganucléase

MPLA: Monophosphoryl lipid A

OAS: oligoadénylate synthétase

ORF: Open Reading Frame

PABP: Poly A binding protein

PABPC1: PolyA binding protein cytoplasmic 1

PAN: Poly A nuclease

Pb : Paire de base

PBAE : Poly β -amino ester

PEG : Polyéthylène glycol

PEI : Polyéthylène imine

PKR : Protein kinase RNA-activated

PRR: Pattern recognition receptor

RBP: Retinol-Binding Protein

RIG-1: Retinoic acid-inducible gene I

RLR: RIG-I-Like receptor

RSV: Respiratory Syncytial Virus

TAA: Tumor-associated antigen

TALEN: Transcription Activator-like Effector Nuclease

TANK: TRAF member-associated NF-kappa-B activator

TBK1: TANK-binding kinase 1

TCA: Transfert cellulaire adoptif

TCR: T cell receptor

Th: Lymphocyte T helper

TLR: Toll Like Receptor

TNF: Tumor necrosis factor

TR: Trans-réplicon

TRAF: Tumor necrosis factor receptor-associated factor

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β

TSA: Tumor-specific antigen

TUT: Terminal Uridyltransferase

UTR: Untranslated Transcribed Region

VEGF-A: Vascular endothelial growth factor / facteur de croissance endothélial

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

ZFN: Zinc finger nuclease

Liste des figures

Figure 1: Les éléments structuraux de la région 5'UTR.....	20
Figure 2: Représentation schématique des différentes étapes d'expression des gènes dans la cellule eucaryote.....	21
Figure 3: Représentation des différents Types d'ARNm IVT	24
Figure 4: Structures des système lipidiques.....	32
Figure 5: Structures des systèmes lipidiques	33
Figure 6 : Formation d'un complexe Protamine/Acides nucléiques par liaison des acides nucléiques chargés négativement à la protamine riche en Arginine	34
Figure 7: Représentation schématique de la cascade signalétique induite par le système immunitaire en réponse à l'introduction d'ARNs exogènes dans la cellule.	43
Figure 8: Structures des nucléotides non modifiés et leurs versions chimiquement modifiées	48
Figure 9: Méthodes d'optimisation de la transcription in vitro.	55
Figure 10: Réponse immunitaire d'une CPA à la transfection par un vaccin à ARNm.	62

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différentes méthodes de livraison des nucléases.....	80
--	----

Liste des annexes

Annexe 1: Les dates clés des découvertes et des avancées dans le développement de l'ARNm en thérapie	92
Annexe 2: Méthodologie d'extraction des données à partir du site ClinicalTrials.gov.....	93
Annexe 3: Essais cliniques des vaccins à ARNm contre les pathogènes hors SARS-COV2	94
Annexe 4: Essais cliniques des Vaccins ARNm contre le SARS-CoV-2	96
Annexe 5: Essais cliniques des vaccins à ARNm en cancérologie.....	98
Annexe 6: Essais cliniques d'immunothérapie passive à ARNm IVT	99
Annexe 7: Essais cliniques des protéines de remplacement codés par ARNm IVT	100
Annexe 8: Essais cliniques des éditions du génome à ARNm IVT	101

Résumé :

L'ARN messenger transcrit *in vitro* a récemment accédé à un nouveau statut de médicament et a suscité l'enthousiasme de la communauté scientifique et du grand public. Les nombreux travaux scientifiques visant à optimiser sa structure (augmentation de sa stabilité et diminution de son immunogénicité), à standardiser les méthodes de synthèse et améliorer les techniques de transfection dans les cellules cibles ont permis à l'ARNm d'être utilisé pour la prévention ou le traitement de certaines pathologies chez l'homme. Les principaux domaines thérapeutiques explorés incluent les vaccins en infectiologie et en cancérologie, les immunothérapies ou les thérapies de remplacement. Dans le futur, les ARNm pourraient même être utilisés pour des thérapies innovantes de médecine régénérative faisant intervenir l'édition du génome et la reprogrammation cellulaire. Le potentiel de l'ARNm en tant qu'agent thérapeutique et prophylactique a été mis en lumière par le bénéfice sociétal des vaccins BNT-162 et mRNA-1273.

Introduction

Ces deux dernières années ont été marquées par l'émergence du virus SARS-CoV-2 à l'origine d'une pandémie meurtrière. Face à la paralysie mondiale observée tant sur le plan social que économique, une course aux vaccins a été lancée afin de protéger les populations et retrouver au plus vite la vie d'avant la COVID 19. Les tout premiers vaccins à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché étaient des vaccins formulés à base d'ARN messenger codant pour une protéine spécifique du virus, la protéine Spike. Cette technologie était alors méconnue du grand public et a suscité des réactions controversées entre émerveillement et inquiétude. En effet, bien que la prouesse technologique ait été saluée par une grande partie de la société et de la communauté scientifique, certains médecins ont communiqué sur un potentiel manque de recul sur ce type de vaccins.

La découverte de cette technologie remonte pourtant à quelques décennies.

C'est en 1961 que l'ARN messenger a d'abord été découvert par Brenner et al (Frise chronologique des dates clés en annexe 1^{1,2}). Il a ensuite été scrupuleusement étudié afin de décrypter ses caractéristiques et ses différentes interactions avec son environnement *in vitro* et *in vivo*. C'est en 1990 que l'ARNm a montré pour la première fois son potentiel en tant qu'agent thérapeutique suite à sa traduction réussie dans un modèle murin.

Cependant, le développement de l'ARNm dans le domaine thérapeutique s'est heurté à de nombreux défis tels que sa toxicité *in vivo*, le besoin d'un véhicule de livraison efficace ou encore son manque de stabilité et donc sa durée de vie courte. Ces obstacles ont alors dissuadé la recherche dans ce domaine. Katalyn Kariko et son équipe ont démontré dès 2005 que l'introduction de certaines modifications sur les nucléosides rendait les acides nucléiques non immunogènes. Cette avancée remarquable a donné le signal de départ pour de nombreuses recherches afin d'affiner les connaissances sur l'ARNm et faciliter son utilisation en tant qu'agent thérapeutique.

Au cours des années qui ont suivi, divers essais précliniques et cliniques ont été initiés afin de définir les potentialités prophylactiques et thérapeutiques de l'ARNm.

Cette thèse a pour objectif de passer en revue les différentes avancées qui ont abouti à la concrétisation de l'usage des thérapies à ARNm en clinique. Tout d'abord, l'intérêt se

portera sur les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de l'ARNm synthétisé *in vitro* et les moyens techniques mis en œuvre pour garantir une transfection et traduction efficace dans les cellules. Ensuite, les différentes applications prophylactiques et thérapeutiques seront évoquées afin de mettre en avant les progrès scientifiques achevés autour de l'ARN messenger.

Partie 1 : Les ARN messagers Transcrits In Vitro « ARNm IVT »

I- L'ARN messenger, un intermédiaire clé dans l'expression du génome

1- Les différents types d'ARN

Les ARNs retrouvés naturellement dans les cellules peuvent être divisés en 2 catégories : Les ARN codants pour des protéines (ARNm) et les ARN non codants pour des protéines :

a- ARN codants

Il s'agit de l'ARN messenger, le sujet principal de ce travail. Cet ARN est l'intermédiaire entre le code génétique sous forme d'ADN et la manifestation de ce code sous forme de protéines.

b- ARN non codants

- ARNr : Ils sont au nombre de 5 chez les eucaryotes supérieurs. L'ARN ribosomique est un facteur clé de la traduction génique et l'ARN le plus répandu dans la cellule. En effet les ARNr se lient à des protéines ribosomiques pour constituer la grande sous-unité et la petite sous-unité qui en s'assemblant forment le ribosome. Une fois assemblé, le ribosome est une formidable machine moléculaire de production de protéines.³
- ARNt : Il en existe plus de 40 différents. L'ARN de transfert joue aussi un rôle important dans la traduction. Il est constitué d'environ 80 nucléotides et sert « d'adaptateur » lors de la traduction. En effet, il permet d'associer aux codons de l'ARNm les acides aminés correspondants pour former le peptide.⁴
- ARNsno : Petit ARN nucléolaire, présent au niveau du nucléole et sa fonction est de contribuer à la maturation des ARNr.⁵

- ARNsn : Petit ARN nucléaire, présent au niveau du noyau. Il contribue à la maturation des ARNr et à l'épissage des ARNm. Les cinq principaux ARNsn de mammifères sont U1, U2, U4, U5 et U6.⁶

Les ARNsn et ARNsno possèdent une activité catalytique du fait en partie de leur structure secondaire.

- Endo-siRNA ou ARNsi : Les petits ARNs interférents sont des ARNdb d'environ 20 nucléotides (19 à 22). Ils proviennent de précurseurs bien plus longs clivés grâce à DICER. Ils se lient de façon spécifiques à certains ARNm grâce à une machinerie complexe protéique (complexe RISC : RNA Induced Silencing Complex) pour provoquer soit l'inhibition de la traduction soit le clivage et donc la dégradation de ces derniers.⁷
- Pi-RNAs (ARN en interaction avec PIWI) : Ils proviennent également d'un précurseur mais ne sont pas des substrats de DICER. Il en existe plus de 50000 et font une taille de 26 à 31 nt. Comme les endo-siRNA ils ont un rôle de régulation négative de l'expression des éléments répétés du génome.⁸
- ARNmi : Il s'agit d'un ARNsb régulateur précurseur et présentant, suite à son repliement, une structure en épingle à cheveux. Un précurseur peut donner naissance à un ensemble d'ARN interférents analogues aux siRNA par intervention de DICER. Ces ARNdb s'associeront également au complexe RISC pour inhiber la traduction de certains ARNm.⁷
- ARNlnc : L'ARN long sans potentiel codant est constitué de 200 nucléotides à plus de 100000 nucléotides. Il participe aux mécanismes de régulation transcriptionnels et post-transcriptionnels de la cellule notamment à travers les modifications épigénétiques.⁹

2- Structure de l'ARNm

L'ARN messager est une molécule monocaténaire d'acide ribonucléique composée d'un enchainement de nucléotides. Les bases azotées constituant les acides nucléiques sont : Adénine, Guanine, Cytosine et Uracile. Ces bases se lient ensuite à un ribose pour former un nucléoside qui sera phosphorylé sur le groupement OH du C5 du ribose pour donner des nucléotides.

Le pré-ARNm subira des modifications post transcriptionnelles pour donner l'ARNm mature. Ces modifications consistent en l'addition d'une coiffe en 5' (7 méthyl Guanosine phosphate), l'épissage (élimination des introns) et l'addition d'une queue poly (A) en 3'.

La structure de l'ARNm mature est donc :

- Une coiffe en 5' : Il s'agit d'une 7 méthyl Guanosine liée au premier nucléotide de l'ARNm par une liaison triphosphate (7mGpppN). Elle a un rôle protecteur en empêchant l'action des exonucléases 5' → 3' et participe au transfert de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme pour sa traduction. Elle contribue également à l'initiation de la traduction.
- Une région appelée région non traduite 5' (5' UTR) se trouve en amont de la séquence codante. Elle joue un rôle dans la modulation de l'initiation de la traduction. Elle contient des structures secondaires et tertiaires et d'autres éléments de séquence (Figure 1) : Au niveau des UTR en 5' sont retrouvées des structures telles que des pseudo-noeuds, des épingles à cheveux et des G-quadruplexes d'ARN (RG4s). On peut observer également la présence de mini cadres de lecture ouverts en amont (uORFs) ayant pour fonction principale d'inhiber la traduction par capture des ribosomes. La région 5'UTR peut contenir également un ou plusieurs sites d'entrée ribosomiques internes (IRES) qui médient l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe. On peut retrouver dans la région 5'UTR une séquence dite de M. Kozak autour du codon d'initiation de la traduction qui favorisera la reconnaissance de l'AUG par la grande sous unité du ribosome.^{10,11}

- ORF : Il s'agit du cadre de lecture ouvert ou la région codante. L'ORF démarre avec un codon de départ AUG et se termine par un codon stop (UAA, UAG, UGA) signalant l'arrêt de la traduction. Au milieu se trouve une suite de codons qui donne lieu à une protéine donnée.¹⁶
- La région UTR 3' non traduite se trouve immédiatement après le codon stop. Elle peut influencer la polyadénylation, l'efficacité de la traduction, la localisation et la stabilité de l'ARNm. Elle contient des sites de liaison pour les protéines régulatrices et les ARNmi qui peuvent diminuer l'expression génique de divers ARNm en inhibant la traduction ou en provoquant directement la dégradation du transcrit. Elle peut contenir également des éléments riches en AU, les « ARE ». Les protéines se lient aux ARE pour affecter la stabilité ou le taux de dégradation des transcrits. De plus, l'UTR 3' contient la séquence AAUAAA qui dirige l'ajout de plusieurs centaines de résidus d'adénine pour former la queue Poly A.¹² Il y a également l'élément de polyadénylation cytoplasmique « CPE » qui est riche en AU et situé près du signal de polyadénylation nucléaire classique. Le CPE n'est pas identique dans tous les ARNm, mais il a la structure générale UUUUUUAU avec un minimum de UUU-UAU ; sa position précise par rapport à l'AAUAAA varie, mais les deux signaux sont généralement à moins de 100 nt. Une fois liée à sa protéine de liaison « CPEB », il y a extension de la queue polyA existante ce qui engendre une activation de la traduction de l'ARNm.¹³

La longueur moyenne des UTR 5' est d'environ 200 nucléotides, alors que la longueur moyenne des UTR 3' est en moyenne de 800 nucléotides.¹⁴

Un autre ensemble d'éléments présents à la fois dans le 5'-UTR et le 3'-UTR sont les éléments de réponse au fer (IRE). L'IRE est une structure en boucle à l'intérieur des régions non traduites des ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire du fer. Le transcrit de l'ARNm contenant cet élément est soit dégradé, soit stabilisé en fonction de la liaison de protéines spécifiques et des concentrations intracellulaires en fer.¹⁵

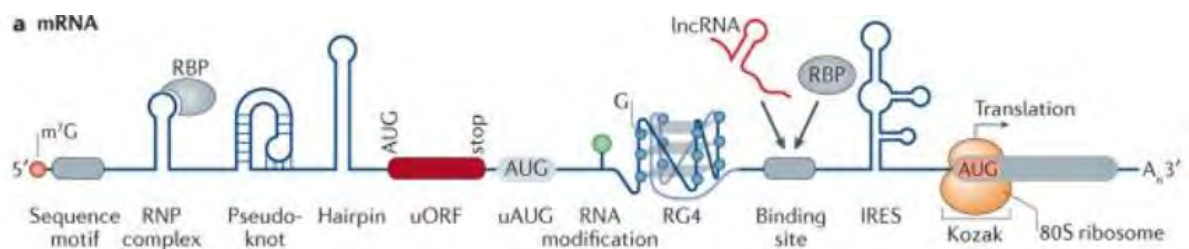


Figure 1: Les éléments structuraux de la région 5'UTR

- Queue poly A : Il s'agit de la terminaison de l'ARNm, une chaîne d'adénosines d'environ 200 nucléotides. C'est aussi un déterminant majeur de l'expression des gènes. La queue poly(A) protège le transcrit de la dégradation exonucléolytique et est liée à la protéine cytoplasmique essentielle de liaison poly(A) Pab1 (PABPC1) qui à son tour est importante pour l'initiation efficace de la traduction et la stabilité du transcrit.¹⁷

3- Place de l'ARNm dans l'expression des gènes

L'ARNm est un intermédiaire clé dans l'expression du génome humain. En effet, il a pour rôle de transmettre l'information génétique du noyau vers le cytoplasme pour pouvoir être exprimée en protéines. La transcription est la première étape qui permet l'obtention du pré-ARNm. Cela est possible grâce à l'ARN polymérase qui a pour fonction de produire un brin complémentaire au brin d'ADN à transcrire. Le pré-ARN ainsi formé subit ensuite une étape de maturation avec l'addition de la coiffe en 5' et de la queue poly A en 3', l'excision des introns grâce au spliceosome et la liaison des exons. L'ARNm mature est ensuite transloqué à travers les pores du noyau vers le cytoplasme où il va être traduit en protéines.¹⁸

Tout au long de la vie des ARNm, des protéines de liaison à l'ARN « RBP » modulent les modifications de sa composition, sa localisation, sa traduction et sa dégradation.¹⁹ Le processus de dégradation des ARNm sera décrit plus tard dans la partie « Elimination des ARNm IVT dans la cellule ».

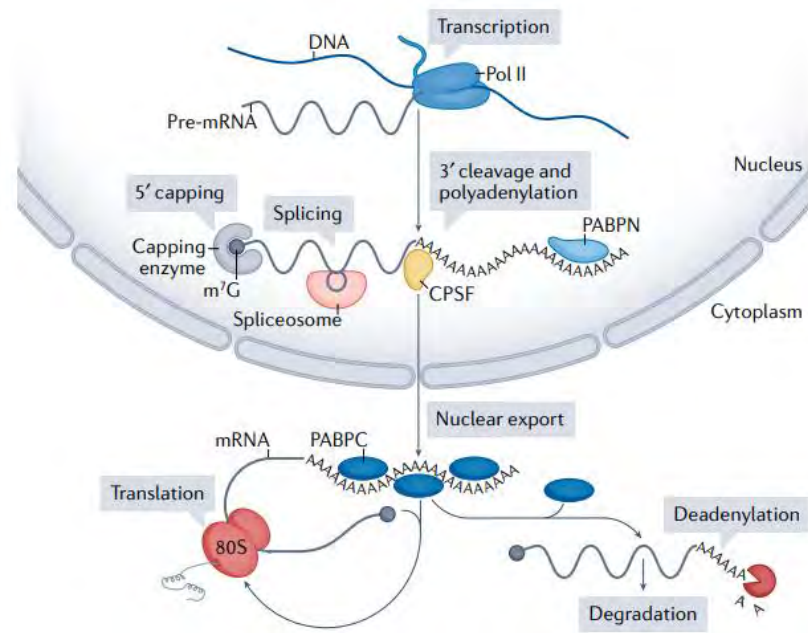


Figure 2: Représentation schématique des différentes étapes d'expression des gènes dans la cellule eucaryote²⁰

En 1984, l'ARNm a été transcrit *in-vitro* pour la première fois ouvrant alors la porte à sa potentielle utilisation à des fins thérapeutiques. Pour arriver à ces fins, Il a fallu maîtriser les moyens qui permettraient la réussite d'un tel projet. Les parties qui vont suivre s'intéressent de près à l'ARNm IVT.

II- Les types d'ARNm obtenus par transcription *in vitro*

Trois types d'ARNm générés par transcription *in-vitro* sont possible.

1- ARNm non-amplificateur

Il s'agit de l'ARNm IVT dit conventionnel. Il contient la séquence codant pour la protéine d'intérêt bornée par 5'UTR et 3'UTR. Une coiffe en 5' ainsi que la queue Poly A en 3' sont aussi intégrés à l'ARNm (Figure 3A). Ce dernier sera traduit immédiatement dans la cellule grâce à la machinerie de traduction interne de la cellule cible.²¹

Les principaux avantages de ce type d'ARNm sont la simplicité d'obtention et la taille relativement petite de l'ARNm obtenu. Mais la durée de vie des ARNm conventionnels reste limitée dans le temps ce qui ne permet qu'une expression transitoire des protéines dans les cellules. L'expression des protéines a été estimée à environ 6 jours. Pour cela, de l'ARNm codant pour la luciférase a été injecté en intra-musculaire chez la souris pour ensuite visualiser son expression à différents moments à l'aide d'un système d'imagerie in vivo « IVIS spectrum » après injection intrapéritonéale de D-luciférine. ^{21,22}. Ces limites peuvent être régulés en optimisant la structure des ARNm et ainsi améliorer leur stabilité et leur interaction avec les éléments de traduction.

2- ARNm auto-amplificateur

Ces ARNm sont conçus en se basant sur les caractéristiques du génome des virus à ARN simple brin à polarité positive comme les alphavirus, flavivirus ou picornavirus. Ces virus ont la particularité d'avoir un ARN avec une partie non structurale qui code pour des protéines formant ensemble un complexe ARN polymérase ARN dépendante aussi appelé « Réplicase » et une partie structurale de gènes viraux. L'ARNm IVT mime les caractéristiques répliquatives de l'ARN de ces virus en gardant la partie non structurale et en remplaçant les gènes structuraux par le gène d'intérêt (Figure 3B). Il a la capacité, grâce à la séquence codant pour l'enzyme « Réplicase » de s'auto répliquer et produire d'autres copies d'ARNm. ²¹

Ce Type d'ARNm IVT permet d'obtenir de plus grandes quantités de protéines d'intérêt et pour une durée prolongée. La durée de détection des protéines a atteint 14 jours selon une étude sur un vaccin à ARNm auto-amplificateur contre 6 jours pour un vaccin à ARN conventionnel ^{23,24}. Ceci permet également de réduire significativement les doses administrées par rapport à l'ARNm conventionnel : pour une réponse équivalente, le vaccin à ARNm auto-amplificateur était 64 fois moins dosé que celui à ARNm conventionnel selon une autre étude sur des vaccins à ARNm ²².

Ce type d'ARNm présente néanmoins quelques problématiques ralentissant leur développement. En effet, l'ARNm auto-amplifiant ayant une séquence plus longue que l'ARNm conventionnel (9000-12000 nucléotides pour l'ARNm auto-amplifiant contre 1000-

5000 nucléotides pour l'ARNm conventionnel²³) requiert un procédé de production plus robuste afin de garantir la stabilité de l'ARNm. ^{21,22}. De plus les tentatives d'optimisation de la stabilité et de contrôle de la réponse immunitaire en agissant sur la nature des nucléotides n'est pas possible car cela nuit à la reconnaissance et à l'amplification médiée par l'ARN polymérase ARN dépendante (Réplicase). ²¹

Les ARNm IVT auto-amplificateurs sont toujours au stade expérimental et n'ont été testés que sur des modèles animaux ²¹.

3- ARNm trans-amplificateur

Ce type d'ARNm IVT est un intermédiaire entre l'ARNm conventionnel et l'ARNm auto-amplificateur. En effet, le gène codant pour la réplicase est supprimé de l'ARNm auto-amplificateur pour garder seulement le gène codant pour la protéine d'intérêt appelé alors « trans-réplicon ». La réplicase est alors codée sur un autre ARNm qui va être co-transfecté avec le trans-réplicon « TR » (Figure 3C). L'interaction Réplicase/TR est assurée par une séquence en régions 5' et 3' que le TR aura conservé de l'ARNm auto-amplificateur parental.

^{22,25}

Les ARNm trans-amplificateurs peuvent être avantageux par rapport aux ARNm auto-amplificateurs et conventionnels : Tout d'abord grâce à leur sécurité améliorée car théoriquement la protéine produite peut former avec l'ARNm un pseudo-virus qui pourra quitter la cellule vers d'autres tissus or avec la présence de 2 brins d'ARNm distincts ceci devient moins probable. Ensuite grâce à leur coût qui serait baissé car le gène codant pour la réplicase serait produit individuellement et valable pour tous les types de TR et aussi grâce à leur procédé de fabrication qui serait moins complexe vu qu'il y aura une diminution de la taille de l'ARNm. ²⁵

Ces ARNm sont utilisés pour étudier les mécanismes et les structures requises pour la réplication de l'alphavirus ou pour la production de recombinants. La piste des vaccins est étudiée depuis peu. ²⁵

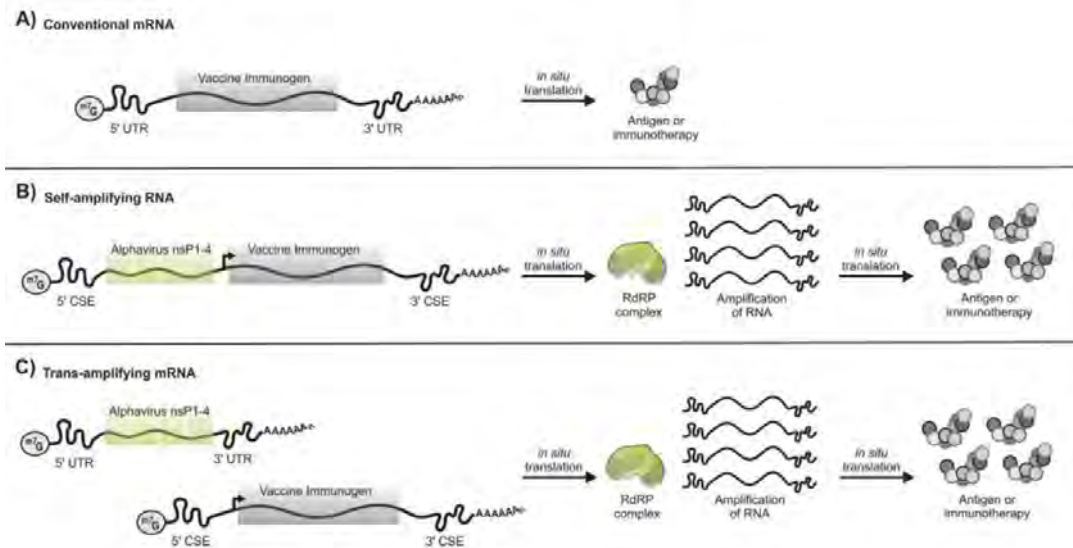


Figure 3: Représentation des différents Types d'ARNm IVT²²

III- La transfection des ARNm IVT dans les cellules cibles et les tissus cibles

Plusieurs cellules peuvent capter l'ARNm IVT grâce au récepteur Scavenger par endocytose. Il y a alors accumulation au niveau des Lysosomes à travers lesquels il y aura libération de petites quantités dans le cytoplasme. Les mécanismes de libération dans le cytoplasme sont peu connus et peuvent différer entre les différents types de cellules. Dans la plupart des cellules l'absorption active de l'ARNm est inefficace et rapidement saturée à des doses très faibles. Pour cela, un transporteur est nécessaire à la livraison de l'ARNm IVT dans les cellules.^{1,26}

L'ARNm peut faire face à plusieurs barrières qui rendent difficile son cheminement vers les cellules :

- La membrane cellulaire :

Elle est constituée d'une double couche lipidique de phospholipides zwitterioniques et chargés négativement. La tête polaire des phospholipides est dirigée vers le milieu aqueux et la queue hydrophobe est dirigée vers le cœur hydrophobe. Diverses pompes à ions et canaux ioniques maintiennent le potentiel négatif (-40 à -80 mV) de la membrane cellulaire et la

charge négative de l'espace cytoplasmique en contrôlant le transfert des principaux ions métalliques (e.g., K⁺, Na⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺). Le potentiel négatif de la membrane cellulaire crée une barrière face aux ARNm hautement chargés négativement.²⁷

Les lipides insaturés augmentent la fluidité membranaire. L'autre composant majeur qui est le cholestérol aide à maintenir un équilibre entre la fluidité et la rigidité de la membrane cellulaire.²⁷

- La taille de l'ARNm :

Les molécules de taille inférieure à 1000 Da diffusent passivement à travers la membrane cellulaire. Certains types de cellules peuvent spontanément capturer un ARN nu mais le taux est inférieur à 0,00001%.²⁸

La taille de l'ARNm est significativement élevée (300-5000 kDa ~1–15 kb) et constitue un grand obstacle pour son absorption intracellulaire.²⁷

- Ribonucléases extracellulaires :

Les RNases dans le milieu extracellulaire sont responsables de la dégradation des ARNm.²⁹

- Libération des endosomes :

Une fois l'ARNm a atteint la cellule, le dernier défi est d'être libéré de l'endosome vers le cytoplasme. Il a été estimé que seulement 2% des ARNm sont libérés. Ceci est donc un facteur limitant confirmant que l'entrée seule de l'ARNm dans la cellule n'est pas suffisant pour garantir sa traduction.²⁸

Par conséquent, pour une livraison optimale dans les cellules cibles, des véhicules sont requis pour protéger l'ARNm IVT contre les RNases, faciliter leur entrée dans les cellules en franchissant la membrane cellulaire, faciliter leur libération des endosomes et prévenir la stimulation du système immunitaire par l'ARN étranger.^{29 30}

En général, les approches de transfert des ARNm IVT peuvent être divisées en 2 catégories : Les méthodes physiques et les méthodes chimiques employant des vecteurs non viraux :

1- Les méthodes physiques de transfert des ARNm IVT

Il s'agit de méthodes sans vecteurs reposant sur le changement transitoire de la plasticité des membranes pour permettre l'entrée des ARNm IVT dans les cellules. ²⁹

a- Micro-injection :

La micro-injection implique l'utilisation d'une micropipette pour injecter l'ARNm directement dans une cellule vivante à l'échelle microscopique. L'aiguille mesure environ 0,5 – 5 µm de diamètre. Cette méthode est simple, économique, reproductible et non toxique. Mais elle requiert l'injection du matériel génétique dans chaque cellule cible. Ceci se révèle être très fastidieux et incompatible avec les applications de l'ARNm IVT car il y a besoin d'une production de grandes quantités de protéines d'intérêt. Elle peut néanmoins être utile en recherche.³¹

b- Injection à aiguille :

Il s'agit de l'injection de l'ARNm IVT localement dans les tissus ou organes cibles. Cette méthode est simple d'utilisation et ne présente pas de risque particulier mais ne garantit pas l'expression de l'ARNm IVT nu dans la cellule car ce dernier ne pourra atteindre le cytoplasme qu'en très faible quantité à cause des différentes barrières à franchir.³¹

c- Injection à jet :

L'injection à jet se fait sans aiguille et repose sur l'utilisation d'un gaz pressurisé (par exemple le CO₂) pour former un faisceau très fin et très rapide qui va cibler les cellules par jet. Durant l'injection, il y a génération de pores dans la membrane cellulaire qui vont faciliter le passage intracellulaire de l'ARNm IVT. Par conséquent, cela engendre une plus grande efficacité que l'injection par aiguille. Un autre avantage consiste en la flexibilité de la pression du gaz appliquée au jet qui peut être ajustée au niveau de tolérance mécanique des cellules afin de réduire les dommages causés aux tissus. ^{31,32}

Plusieurs types de tissus peuvent être traités avec cette approche tels que les muscles, la peau ou les tissus mammaires. Jusqu'à présent, aucun effet secondaire grave n'a été rapporté par l'injection par jet à part une hyperémie locale, des œdèmes ou un saignement mineur.³²

d- Gene Gun :

Le pistolet à gènes a été mis au point initialement pour la transformation végétale et ensuite utilisé pour le transfert d'ADN au niveau de la peau, muscles, muqueuses ou les tissus préalablement découverts chirurgicalement. Le matériel génétique (ADN ou ARN) est chargé sur des particules élémentaires de métaux lourds (Or, Tungstène, Argent). Les particules peuvent être accélérées par gaz pressurisé et ensuite tirées sur les cellules ou tissus cibles. Le tir des particules permet une pénétration de quelques millimètres dans le tissu relarguant l'ARNm directement dans les cellules sur son chemin. Certains paramètres jouent sur l'efficacité du transfert et sur le degré de dommages causés aux cellules par exemple la taille des particules, la vitesse ou la dose à administrer.^{31,33}

e- Electroporation :

Cette méthode utilise un courant électrique à haut voltage en direction des cellules cibles pour former des pores de l'ordre du nanomètre au niveau des membranes cellulaires permettant le passage de l'ARNm IVT chargé négativement en intracellulaire. L'électroporation in vivo est applicable à presque tous les tissus testés par exemple les muscles, le foie, les poumons, la peau et de nombreuses tumeurs. Elle présente l'avantage de garantir la localisation de l'ARNm transféré dans le tissu cible, d'être sûre, efficace et reproductible. L'efficacité de transfert de l'ARNm peut être influencée par plusieurs facteurs notamment l'intensité du courant, l'intervalle de temps entre les différentes décharges et la dose à administrer. Les études sur les animaux ont aussi montré que l'efficacité dépendait de l'âge du receveur.^{29,31,34}

Cependant l'électroporation requiert un champ de travail assez large pour placer les électrodes convenablement et ne peut donc être utilisé que sur des tissus avec une surface suffisamment grande. De plus un acte chirurgical est nécessaire pour accéder aux tissus internes et le haut voltage peut causer des dommages aux tissus.³⁴

f- Sonoporation :

La sonoporation est une technique qui utilise des vagues d'ultrasons pour rendre la membrane cellulaire perméable. A chaque cycle ultra-sonique, une partie de l'énergie de propagation des ultra-sons est absorbée pour perméabiliser la membrane et permettre le passage de l'ARNm. La sonoporation se base sur une méthode de diffusion passive tandis que pour l'électroporation l'ARNm est transporté par la force électrique le long du champ électrique ³¹

L'efficacité du transfert dépend de plusieurs paramètres notamment la fréquence des ultrasons et leur intensité, la durée du traitement, la dose d'ARNm utilisée et le tissu cible.

Les avantages de la sonoporation sont la sécurité, la non-invasivité et la possibilité de transfert dans les cellules de tissus internes sans acte chirurgical. Néanmoins le manque d'efficacité du transfert reste un point faible majeur. ³¹

g- Transfert Hydrodynamique :

Le transfert hydrodynamique utilise une haute pression hydrostatique pour livrer l'ARNm dans les organes internes. Quand un grand volume de solution contenant le matériel génétique (plus de 8% du poids du corps) est rapidement injecté (en 5 secondes ou moins), une perméabilité réversible est observée grâce aux pores transitoires induits au niveau de la membrane cellulaire ce qui permet la diffusion de l'ARNm et l'expression de la protéine d'intérêt dans la cellule. ^{29,31}

L'efficacité est déterminée par le type d'organes, le volume injecté, la vitesse de l'injection et la concentration de l'ARNm dans la solution. Cependant, en application clinique le corps humain ne peut pas tolérer l'injection rapide d'une solution équivalente à 8% du poids du corps humain. ³⁵

h- Massage mécanique :

Cette méthode a été rapportée lors d'une étude sur l'expression de gènes dans le foie de souris à la suite d'une injection intra-veineuse de plasmide d'ADN nu suivie d'un simple massage mécanique. Ce dernier peut générer une perturbation transitoire de la membrane

cellulaire permettant la diffusion du plasmide. Le même résultat serait observé avec de l'ARNm.³¹

Dans une étude complémentaire, la relation linéaire entre le niveau d'expression du gène et la pression sanguine veineuse a indiqué que le transfert du gène par massage mécanique pourrait être dû, au moins en partie, à l'effet médié par la pression. Des données supplémentaires restent encore à fournir en lien avec cette méthode.³¹

Toutes ces méthodes physiques bien qu'elles puissent être partiellement efficaces en recherche ou pour une transfection de cellules *ex Vivo*, elles ne sont pas les plus simples d'utilisation en clinique sur l'être humain. Pour les applications thérapeutiques des ARNm IVT, d'autres méthodes de transfert dites chimiques sont plus utilisées.²⁹

2- Les méthodes chimiques de transfert des ARNm IVT

a- Système de transfert basé sur des véhicules lipidiques

Les systèmes de transfert les plus utilisés sont les véhicules lipidiques. Ils ont été largement utilisés en recherche et optimisés au cours du temps. Il en existe aujourd'hui plusieurs catégories.

Les lipides cationiques sont les premiers vecteurs lipidiques à avoir été étudiés pour la transfection d'ARNm. Il s'agit de molécules amphiphiles avec une structure commune de 3 parties : une tête hydrophile composée généralement de groupes amines, une queue hydrophobe et un liant. Une fois dans un milieu aqueux, les lipides cationiques peuvent prendre différentes formes structurales : micellaire, lamellaire, cubique, hexagonale.^{30,31} Ils peuvent former spontanément des lipoplexes avec les ARNm IVT chargés négativement grâce à des interactions électrostatiques (Figure 4a).³⁰ Les lipoplexes sont des nanoparticules qui peuvent être endocytés dans les cellules.²⁶

Le premier lipide cationique synthétique utilisé pour la livraison d'ARNm IVT dans des cellules est le DOMTA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride).

Ensuite plusieurs lipides cationiques ont été développés et étudiés tel que DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammoniummethyl sulfate) qui a démontré une plus grande efficacité à un coût moindre que DOTMA.²⁹ Plus tard des modifications ont été apportées à DOTAP (Figure 4c) avec du carbone apatite (un cristal inorganique avec une très forte affinité pour les acides nucléiques), des additifs inorganiques ou de la fibronectine qui ont permis d'améliorer l'absorption cellulaire des ARNm avec une transfection 5 à 15 fois plus importante.^{29,30}

Les lipides cationiques peuvent être utilisés seuls ou avec un co-lipide. DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) est l'un des co-lipides les plus utilisés (Figure 4c). Il a démontré une amélioration importante de l'efficacité de transfection des cellules quand il est associé à DOTMA ou DOTAP. Cet effet est dû à sa capacité à faciliter la formation des liposomes et à faire passer les lipoplexes de leur structure bicouche à un arrangement hexagonal sous l'effet du pH acide des endosomes facilitant ainsi la fusion ou la déstabilisation de la membrane endosomale et le passage des ARNm dans le cytoplasme pour traduction.^{30,31}

Plusieurs lipides cationiques sont aujourd'hui commercialisés pour la transfection d'ARNm. A titre d'exemple, La Lipofectamine (DOSMA + DOPE) et la TransfectAce (DDAB + DOPE) sont cités.³⁶

La charge positive des lipides cationiques induit des interactions non spécifiques avec des cellules non ciblées et des composants extracellulaires comme les protéines chargées négativement ce qui conduit à l'élimination rapide des agrégats formés par le système immunitaire. Ceci devient un obstacle aux applications *in-vivo* et au développement clinique. Pour surmonter partiellement ce problème, la surface de la nanoparticule est couverte de polymères hydrophiles non chargés comme le Polyéthylène glycol (PEG). Cette stratégie a été largement utilisée pour améliorer le profil de transfection, réduire les interactions non spécifiques et ainsi augmenter le temps de demi-vie des véhicules lipidiques. De plus, le PEG peut être modifié afin d'ajouter à la formulation des capacités de ciblage. Pour cela, des ligands de ciblage permettent de localiser les nanoparticules dans les organes cibles et de limiter les interactions avec les cellules non-cibles.^{30,37}

Il existe aussi un autre moyen d'éviter cet obstacle *in-vivo* en utilisant des lipides ionisables. Ces derniers sont neutres à pH physiologique et sont protonés à pH acide, ce qui

leur donne la charge positive une fois dans les endosomes permettant ainsi l'échappement de l'ARNm dans le cytoplasme. La sensibilité au pH est bénéfique dans le transfert *in-vivo* car les lipides neutres interagissent moins avec les membranes à charge négative et les protéines anioniques du milieu extracellulaire. Une fois dans l'endosome, le pH acide confère la charge positive aux lipides ce qui cause la déstabilisation de la membrane et facilite l'échappement de l'ARNm dans le cytoplasme.^{27,29,30,36}

A titre d'exemple, MLW5, Dlin-KC2-DMA, Dlin-MC3-DMA sont des lipides ionisables commercialisés pour la transfection des ARNm (Figure 4c).³⁶

Aujourd'hui, le système de livraison le plus avancé est constitué de nanoparticules lipidiques appelés LNP (Figure 4b). Les LNP ont prouvé d'abord leur sécurité et efficacité pour le transfert des ARNsi avant d'être utilisées dans les thérapies à ARNm. Elles sont constituées d'un lipide cationique ou ionisable, un co-lipide, du cholestérol, un phospholipide et du Polyéthylène glycol (PEG).^{26,30,31,36,38}

Une autre classe de matériaux de type lipide, caractérisée par des noyaux de polyamine et de multiples motifs de queue hydrophobes, a également été développée grâce à l'utilisation d'une méthodologie de synthèse combinatoire et d'un criblage de bibliothèque. Cette classe de lipides, y compris C12-200, cKK-E12 et 503O13 (Figure 4c), constitue certains des matériaux les plus puissants et les plus modernes pour l'administration de l'ARNsi.³⁰ Anderson et ses collègues ont montré que les LNP C12-200 initialement développées pour l'administration de ARNsi peuvent être optimisées spécifiquement pour l'administration de l'ARNm IVT. La puissance des LNP C12-200 chargées d'ARNm IVT *in vivo* a été multipliée par sept par rapport à la formulation originale en faisant varier les paramètres de formulation des LNP, notamment les rapports de poids des lipides, l'identité des phospholipides et la composition des excipients.²⁶

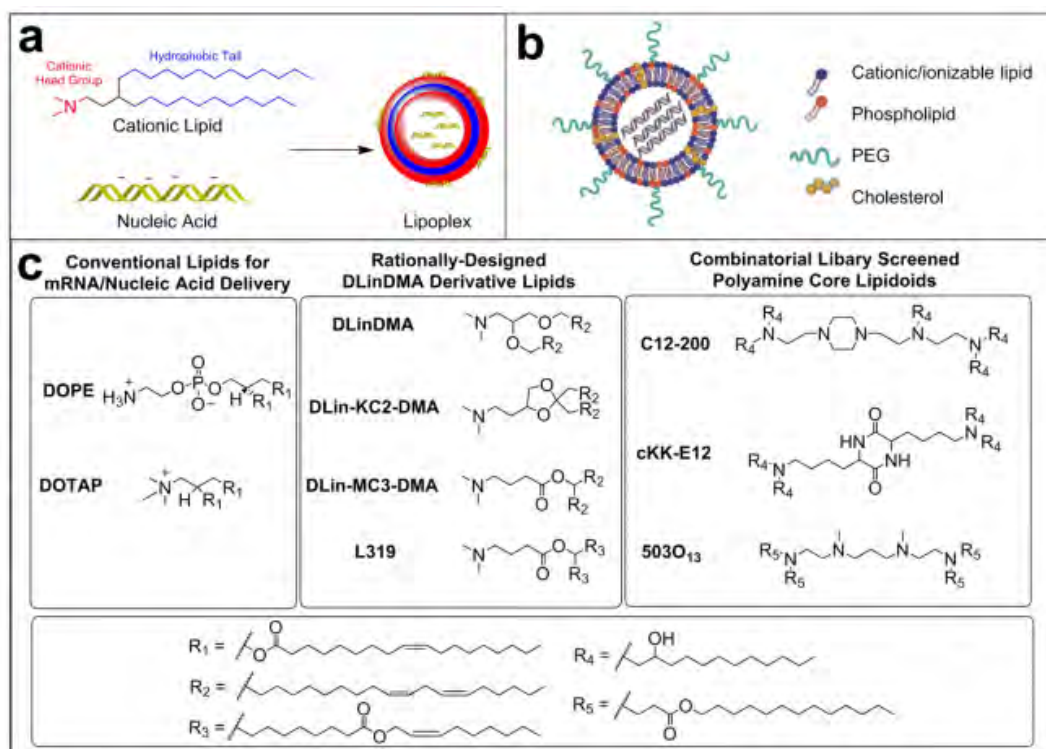


Figure 4: Structures des systèmes lipidiques

(a) Formation des lipoplexes grâce à la liaison électrostatique des lipides cationiques aux acides nucléiques ; (b) Composition d'une LNP ; (c) Structures chimiques des matériaux lipidiques conventionnels DOPE et DOTAP, du Lipide ionisable DLinDMA et ses dérivés, des lipoides à noyau polyamine découverts par criblage. ²⁶

b- Système de transfert basé sur des véhicules polymériques

Les polymères cationiques interagissent de manière non covalente avec les acides nucléiques et permettent une transfection *in vivo* satisfaisante. Ils sont faciles à produire et offrent une grande flexibilité en termes de modification de structure. Même si les polymères ont plus été étudiés dans le transfert de l'ADN et des ARNs, ils présentent un grand potentiel pour le transfert des ARNm et rivalisent avec les systèmes de livraison lipidiques. ³⁰

La complexation de l'ARNm IVT avec les polymères cationiques forme des polyplexes (Figure 5a) qui ont montré une plus grande stabilité que les lipoplexes. Les polymères cationiques ne se lient pas seulement aux ARNm IVT mais se condensent en nanostructures capables d'améliorer le processus d'endocytose, protège l'ARNm IVT des nucléases et facilite son échappement des endosomes. ^{26,30}

Il existe un grand nombre de polymères d'origines naturelle et synthétique.

Un des polymères les plus connus est le polyéthylèneimine (PEI), un polymère hautement cationique et soluble dans l'eau qui peut être sous forme linéaire, en branches ou dendrimères (Figure 5b). Une particularité du PEI est que sa protonation et sa densité de charge augmentent à pH acide ce qui protège les acides nucléiques des nucléases et permet leur libération des endosomes. Malgré cela, le PEI est cytotoxique et non dégradabile ce qui nécessite des modifications sur ce polymère. Les PEI les plus utilisés sont le L-PEI qui est linéaire à 22kDa et le B-PEI en branches à 25kDa, ces deux-là ont une cytotoxicité modérée.^{27,29}

Plusieurs autres classes de polymères inspirées de la transfection de l'ADN et de l'ARNsi peuvent être citées. A titre d'exemple, le Chitosan (un biopolymère composé d'unités de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine) et le PBAE (poly(β -amino esters)), un polymère ionisable, dégradabile, synthétisé grâce à l'addition de diacrylates sur les diamines, sont des polymères utilisés pour la transfection des ARNm IVT (Figure 5b).^{26,31}

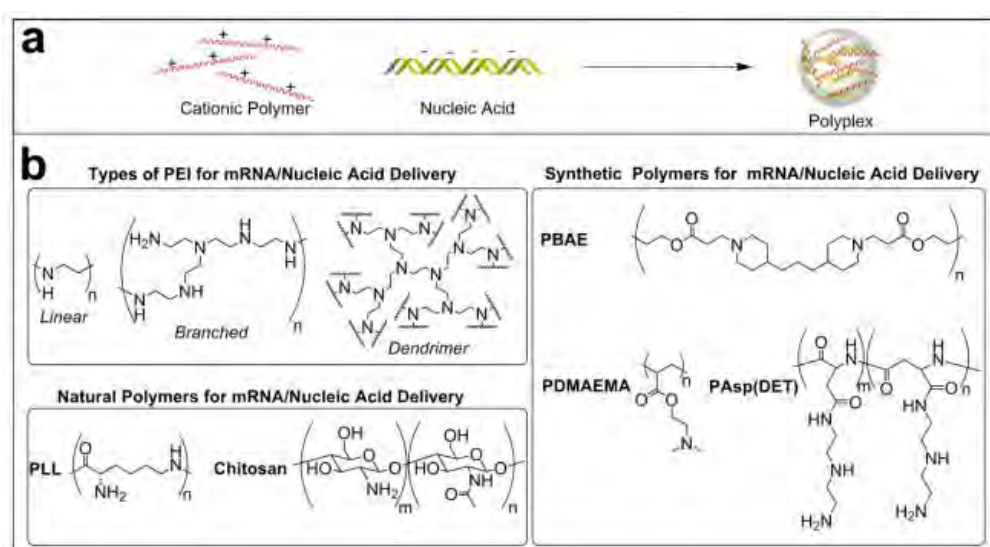


Figure 5: Structures des systèmes lipidiques

(a) Formation de polyplexe par liaison électrostatique des polymères cationiques aux acides nucléiques ; (b) Structures chimiques des PEI, de polymères naturels et synthétiques.²⁶

c- Système de transfert basé sur des véhicules Protéiques

La protamine est une protéine riche en arginine approuvée par la FDA et utilisée comme antagoniste de l'héparine et système d'administration d'insuline.³⁹ En raison de sa capacité à se lier aux acides nucléiques et à former des complexes électrostatiques avec eux,

la protamine a été étudiée en 1961 comme l'un des premiers matériaux pour la transfection de longs ARN.²⁶

La protamine peut se complexer avec l'ARNm pour former des nanoparticules étroitement liées qui ont un diamètre d'environ 300 nm lorsqu'un rapport pondéral protamine/ARNm de 2:1 est utilisé. Sous sa forme condensée par la protamine, l'ARNm est également protégé contre la dégradation par la ribonucléase, bien que la complexation par la protamine soit connue pour augmenter la réponse immunitaire à la fois *in vitro* et *in vivo* par rapport à l'ARNm nu. Les ARN monocaténaire sont des ligands pour les récepteurs TLR7 et TLR8, et les complexes ARNm/protamine activent également ces voies. Bien que l'activation immunitaire ne soit pas souhaitable pour de nombreuses applications des ARNm, comme la thérapie de remplacement des protéines, il s'agit d'une propriété importante dans le domaine des vaccins à ARNm.²⁶

Dans ce sens, CureVac a développé la plateforme vaccinale RNAActive® basée sur des complexes d'ARN formés de protamine, qui servent d'agonistes TLR 7/8 pour induire une réponse des cellules T Th1, tandis que l'ARNm fonctionne comme producteur d'antigène. L'expression de l'antigène dépend fortement du rapport entre la protamine et l'ARNm. Cette plateforme vaccinale a suscité des activations immunitaires favorables contre le cancer et les maladies infectieuses dans les modèles animaux précliniques et chez les patients.²⁷

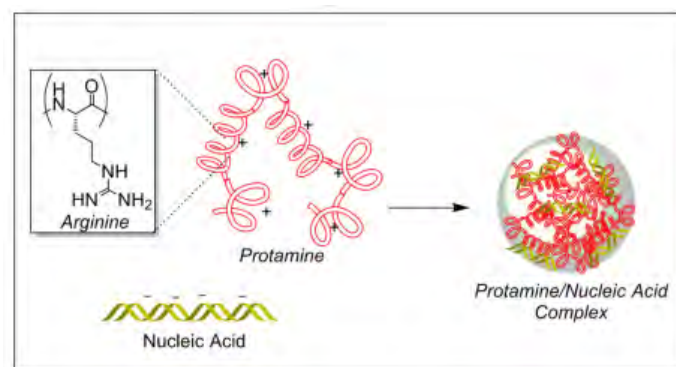


Figure 6 : Formation d'un complexe Protamine/Acides nucléiques par liaison des acides nucléiques chargés négativement à la protamine riche en Arginine²⁶

d- Système de transfert basé sur des véhicules hybrides

Bien que les matériaux de livraison d'ARNm aient été catégorisés individuellement, il est important de noter que l'on peut potentiellement combiner différents matériaux de livraison pour créer des formulations "hybrides". L'ARNm IVT peut être chargé sur des nanoparticules hybrides qui comprennent les lipides, polymères et peptides dans une seule structure pour une transfection plus puissante. Le complexe ternaire composé des acides nucléiques, polymères cationiques et liposomes forme les lipopolyplexes.^{26,30}

Une stratégie communément utilisée consiste en la complexation d'abord des acides nucléiques avec la protamine pour neutraliser la charge de l'ARNm, le protéger des nucléases et par la suite constituer une nanoparticule.²⁶

Les nanoparticules hybrides présentent les nombreux avantages potentiels de leurs composants et offrent ainsi une plus grande flexibilité par rapport aux systèmes non hybrides pour l'administration de l'ARNm IVT.³⁰

3- Les stratégies de transfection

En fonction des applications thérapeutiques des ARNm IVT, les cellules sont transfectées soit *ex vivo* pour ensuite être réintroduites dans le corps du patient soit *in vivo* selon différentes voies d'administration.^{1,28}

Les stratégies de transfection des cellules *in vitro* utilisent surtout les méthodes physiques comme l'électroporation mais la transfection *in vitro* a aussi bénéficié des avancées des méthodes chimiques et de leur disponibilité sur le marché afin de fournir une meilleure protection aux ARNm IVT et augmenter le taux de transfection. La transfection *in vitro* a été utilisée pour des applications en immunothérapie, en édition de génome et en reprogrammation cellulaire.^{1,28}

Pour des transfections *in vivo*, les méthodes chimiques sont privilégiées afin de surmonter les différentes barrières auxquelles fait face l'ARNm IVT une fois administré. L'utilisation des nanoparticules lipidiques reste une méthode de choix afin de garantir une

efficacité optimale. La transfection *in vivo* est surtout appliquée en vaccination et en thérapies par remplacement protéique.^{1,28}

4- Les sites d'administration des ARNm IVT *in Vivo*

La voie d'administration des ARNm IVT est déterminée en fonction de l'objectif thérapeutique recherché, du tissu cible et des propriétés des nanoparticules véhiculant les ARNm. En effet, elle influence la cinétique de distribution, d'expression et l'efficacité thérapeutique.³⁶

a- Voie intra-veineuse

Après une administration intraveineuse (i.v.), de nombreuses nanoparticules lipidiques peuvent s'accumuler dans le foie. Le foie est intrinsèquement capable de produire des protéines sécrétoires et par conséquent, l'administration i.v. de formulations nanoparticules lipidiques-ARNm peut être utilisée pour produire des protéines en déficit dans les troubles métaboliques et hématologiques héréditaires, ou pour produire des anticorps pour neutraliser les agents pathogènes ou cibler les cellules cancéreuses. Ces applications nécessitent la traduction de protéines sans stimulation d'une réponse immunitaire, ce qui peut limiter l'efficacité d'un traitement par injections répétées.^{27,36}

Cependant, l'administration i.v. peut également conduire à l'accumulation de nanoparticules lipidiques dans de multiples ganglions lymphatiques à travers le corps, ce qui pourrait augmenter les réponses immunitaires aux vaccins ARNm.³⁶ Ceci a d'ailleurs poussé des compagnies comme BioNtech à explorer cette voie d'administration pour des vaccins dans de nombreux essais cliniques en phase I.²⁷ Il a été démontré que l'administration i.v. de vaccins à ARNm induisait des réponses de cellules T cytotoxiques spécifiques de l'antigène plus fortes que l'injection locale. Cependant, une large distribution des vaccins ARNm dans le corps peut conduire à des effets indésirables systémiques, et, par conséquent, il peut être nécessaire de développer des nanoparticules lipidiques qui permettent une livraison ciblée des vaccins ARNm dans les tissus où résident des cellules immunitaires abondantes.^{36,40}

b- Voie topique

Les voies d'administration topique ont également été explorées pour les ARNm thérapeutiques. L'administration topique vise à obtenir des effets thérapeutiques locaux ; par exemple, l'injection locale de nanoparticules lipidiques à ARNm permet de cibler l'expression des protéines thérapeutiques dans des tissus spécifiques, comme le cœur, les yeux ou encore le cerveau.

Il est à noter comme exemple que l'administration intradermique d'ARNm codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) chez des patients atteints de Diabète de type 2 a conduit à l'expression de la protéine dans la peau, même en l'absence de nanoparticules lipidiques. Par conséquent, l'administration d'ARNm codant pour le VEGF par injection directe dans le muscle cardiaque de patients subissant un pontage coronarien est actuellement testée dans le cadre d'un essai randomisé de phase II⁴¹. L'expression locale de l'ARNm codant pour VEGF dans certains tissus cibles représente une approche prometteuse pour le traitement des patients atteints de maladies impliquant une ischémie périphérique ou myocardique, telles que l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, l'accident vasculaire cérébral et le diabète de type 2 (DT2).

c- Voie sous-cutanée et voie intra-musculaire

Les voies intra-musculaire et sous-cutanée sont les plus utilisées dans la vaccination à ARNm IVT. Cela est dû à la présence de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes « CPAs » localement dans les muscles et la peau ce qui permet de capter et traiter rapidement les antigènes codés. De plus, les vaisseaux sanguins et lymphatiques de ces tissus permettent d'atteindre rapidement les nodules lymphatiques pour stimuler l'immunité. L'administration par voie intra-musculaire et sous-cutanée de nombreux vaccins à ARNm sous essais cliniques donne des réponses immunitaires robustes à des doses tolérées par l'homme. ^{27,36}

d- Voie intrathécale

Cette voie est à l'étude pour atteindre les cellules du système nerveux central.¹

e- Voie intra-nodale

Il s'agit d'une injection directe dans le nodule lymphatique, foyer majeur des cellules immunitaires.⁴²

En comparant à différentes voies d'administration (i.v et i.m), il a été observé une immunité cellulaire T spécifique de l'antigène étonnamment puissante après injection intra-nodale d'ARN codant pour un antigène nu. L'ARN a été sélectivement absorbé par les cellules dendritiques résidentes, a contribué à la formation d'un milieu intra lymphatique propice à la stimulation des cellules T, et a conduit à une expansion efficace des cellules T CD8+ et CD4+ spécifiques de l'antigène.⁴²

Cette voie d'administration a été utilisée chez l'homme pour la première fois en 2013 sur 13 patients atteints de mélanomes à un stade métastatique. Les patients ont été immunisés contre dix néo-épitopes chacun par injection d'ARNm IVT en intra-nodal. Cela a généré une réponse rapide importante des lymphocytes T.⁴³

f- Voie intra-tumorale

Les ARNm IVT codant pour des stimulateurs de l'immunité peuvent être directement administrés dans les tissus tumoraux afin de favoriser un environnement pro-inflammatoire local qui va activer les cellules immunitaires et la réponse antitumorale.³⁶ La vaccination par voie intra-tumorale est aussi à l'étude car ceci pourrait offrir l'avantage d'une activation rapide et spécifique des cellules immunitaires résidentes dans le tissu tumoral.²⁷

IV- Elimination des ARNm IVT dans les cellules

Afin de mieux prédire l'efficacité d'expression des ARNm IVT et garantir un temps de demi-vie maximal, il a fallu comprendre par quel mécanisme l'organisme élimine les ARNm endogènes et comment le système immunitaire réagit à la présence d'ARNm exogènes dans le corps. En se basant sur ces éléments, des modifications seront apportées à l'ARNm IVT en fonction des objectifs thérapeutiques attendus afin de garantir une efficacité optimale.

1- Mécanismes de dégradation de l'ARNm *in Vivo*

La dégradation de l'ARN est un processus clé dans la régulation de l'expression des gènes. Dans tous les organismes, la dégradation de l'ARN participe au contrôle des niveaux d'ARN codants et non codants en réponse à des signaux développementaux et environnementaux. La dégradation de l'ARN est également cruciale pour l'élimination des ARN défectueux. Le contrôle constant de la qualité des ARN permet d'éviter les effets délétères potentiels causés par l'accumulation de transcrits non codants aberrants ou par la traduction d'ARN messagers défectueux. Les organismes procaryotes et eucaryotes sont également sous la menace constante d'attaques d'agents pathogènes, principalement des virus, et une ligne de défense commune implique la digestion par des ribonucléases de l'ARN de l'envahisseur. ⁴⁴

Quand l'ARNm sort du noyau, la queue poly A recrute la protéine cytoplasmique de liaison PABP pendant que la coiffe se lie au complexe eIF4F. Ensuite PABP s'associe avec le complexe eIF4F pour former une boucle liant les terminaisons 5' et 3' de l'ARNm. Cette interaction contribue à la formation du complexe de pré-initiation qui initie la synthèse protéique par le ribosome. ⁴⁴⁻⁴⁶

L'ARNm a une certaine durée de vie et se dégrade au bout d'un certain temps. La dégradation est initiée au niveau de la queue Poly A.

a- Déadénylation

La déadénylation, le processus de dégradation de la queue Poly A est une étape limitante. Elle est médiée par 2 complexes enzymatiques : Tout d'abord le complexe PAN2/3 dans lequel PAN2 est une sous-unité catalytique, ensuite le complexe CNOT avec de nombreuses sous-unités parmi lesquels CCR4 et CAF1 sont des sous-unités catalytiques. ^{44,46}

La queue Poly A est constituée initialement de plus de 200 nucléotides. Elle est raccourcie par le complexe PAN2/3 jusqu'à atteindre 150 nucléotides mais ce processus de dégradation n'est pas critique pour l'ARNm. En revanche, l'étape qui suit est essentielle à la dégradation de l'ARNm et joue un rôle majeur dans le contrôle de sa stabilité, les 2 sous unités du complexe CNOT ont des activités distinctes au regard de PABP : CAF1 enlève seulement la partie libre de la queue poly A tandis que CCR4 dégrade la partie liée au PABP. ⁴⁶

Quand le dernier PABP est retiré, la structure sous forme de boucle se désassemble et la terminaison 3' de l'ARNm est exposée. La queue de l'ARNm est alors ciblée par les Uridylyl transférase TUT4 et TUT7 pour créer une queue Uridine qui servira de marquage pour l'ARNm déadénylé. La queue Uridine est reconnue par le complexe LSM et d'autres facteurs de dégradation.^{44,46}

b- Décapping

Le décapping ou décoiffage est l'étape ultime irréversible avant l'élimination de l'ARNm. C'est le processus de retrait de la coiffe de l'ARNm. Il est initié par le complexe DCP1/2. DCP2 mène à une dégradation rapide de l'ARNm dans les 2 directions par XRN1 de 5' vers 3' et par l'exosome de 3' vers 5'.⁴⁵

c- Action des ribonucléases

Les ribonucléases se classent en deux catégories :

- Les exoribonucléases avec une activité de 3' vers 5' incluant les familles des Rnases II et D. Les exonucléases peuvent aussi avoir une activité 5' vers 3' comme XRN1 et XRN2. Elles ont pour rôle la maturation des ARNt et la dégradation des ARN.
- Les endoribonucléases peuvent être divisées en trois sous-catégories : celles spécifiques aux ARN simple brin (RNase A, RNase T1), celles spécifiques aux ARN double brin (RNases III) et celles spécifiques à d'autres substrats (RNase H).⁴⁷

Les ribonucléases sont des enzymes abondantes en intracellulaire et extracellulaire, elles ciblent les ARNm non protégés par la coiffe et la queue Poly A. Elles contribuent en grande partie à la défense contre les virus à ARNm et permettent l'élimination des ARNm non fonctionnels.⁴⁵

2- Immunogénicité des ARNm IVT

Le système immunitaire reconnaît et répond aux infections virales au travers des récepteurs de défense anti virale clés : les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires « PRRs » qui ciblent le génome viral qu'il soit sous forme ADN ou ARN (double brin et simple brin). L'activation des PRRs provoque une cascade de signaux induisant la

sécrétion de cytokines et le développement de l'immunité adaptative. Les thérapies à ARNm IVT activent le système immunitaire suivant le même mécanisme basé sur les PRRs. ⁴⁸

Les PRRs qui reconnaissent Les ARNs étrangers seront discutés, notamment les RLRs et les TLRs. D'autres protéines se liant aux ARNdb et qui modulent les réponses au stress cellulaire seront aussi discutées. ⁴⁹

a- RLRs

Les RLRs « Retinoic acid-inducible gene I – like receptors » sont des récepteurs retrouvés au niveau du cytosol des cellules immunitaires et non-immunitaires. ⁴⁸

Lors de l'infection par un virus à ARN, des ARNdb sont formés en intracellulaire et reconnus par les RLRs notamment le gène inductible par l'acide rétinoïque I « RIG-I » et celui associé à la différenciation des mélanomes le « MDA5 ». RIG-I et MDA5 ont la même séquence d'acides aminés avec 2 motifs N-terminaux d'activation et de recrutement des caspases en tandem « CARD », un domaine hélicase central et un domaine C-terminal « CTD ». Lors de la fixation de l'ARNdb par le domaine hélicase et le CTD, les protéines s'oligomérisent le long de l'ARNdb et forment une structure filamenteuse et les 2 motifs CARD activent la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) dans la mitochondrie. Une fois MAVS activée, celle-ci recrute le facteur de nécrose tumorale « TNF », les facteurs associés au récepteur « TRAFs », la kinase liant TANK « TBK1 » et le facteur de régulation de l'interféron 3 « IRF3 » (Figure 4).⁴⁸⁻⁵⁰

Malgré les similarités qu'ils partagent, RIG-I et MDA5 ont des affinités de substrats différentes. RIG-I est sensible aux ARNdb 5'triphosphates (5'-ppp) ou 5'-diphosphates (5'-pp) avec des longueurs allant de 20 pb à 150pb. MDA5, quant à elle, est sensible aux ARNdb plus longs (>1000pb).⁴⁹

b- TLRs

Les TLRs « Toll-like receptors » sont des récepteurs retrouvés au niveau du compartiment endosomal des cellules immunitaires. ⁴⁸

Les ARN pénètrent dans la cellule par endocytose pour être ensuite libérés dans le cytosol. Plusieurs types de TLRs sont localisés sur la membrane de l'endosome et dirigés vers l'intérieur. La reconnaissance d'ARNdb d'une longueur minimale de 40pb par TLR330 induit la

dimérisation du TLR3 et active « TRIF » qui est un adaptateur induisant l'interféron bêta. TRIF recrute ensuite TRAF3 et TRAF6 pour l'activation transcriptionnelle de l'IFN et l'activation de NF- κ B.^{49,50}

Les ARNsb sont également reconnus par TLR7 ou TLR8 dans l'endosome. TLR7 se dimérise lors de sa liaison avec l'ARN, tandis que TLR8 existe sous forme de dimère avant la reconnaissance de l'ARN. Une fois liés à leurs ligands, TLR7 et TLR8 recrutent l'adaptateur de la différenciation myéloïde « MyD88 », qui s'associe à son tour avec le récepteur à l'interleukine-1 associé à la kinase 4 (IRAK4) et IRAK1/IRAK2 pour former le Myddosome. Le Myddosome recrute les TRAF pour activer la signalisation de l'IFN et du NF- κ B. Des études ont montré une très forte affinité des TLR7 et TLR8 pour les ARN riches en uridine.^{48,49}

c- Autres ARNdb-binding protéines

Quand les protéines kinases R « PKR » se lient aux ARNdb avec une longueur minimale de 33 pb, il y a dimérisation et activation par autophosphorylation engendrant alors une phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eucaryote « eIF2 α ». eIF2 α bloque l'initiation de la traduction et provoque l'apoptose médiée par l'activation de NF- κ B.⁴⁹

Il y a également la 2',5' Olygoadénylate synthétase « OAS » qui se lie à l'ARNdb pour produire la 2',5'- oligoadénylate « 2-5A » qui sert de messenger pour l'activation de la RNase L qui dégrade l'ARN cellulaire.⁴⁹

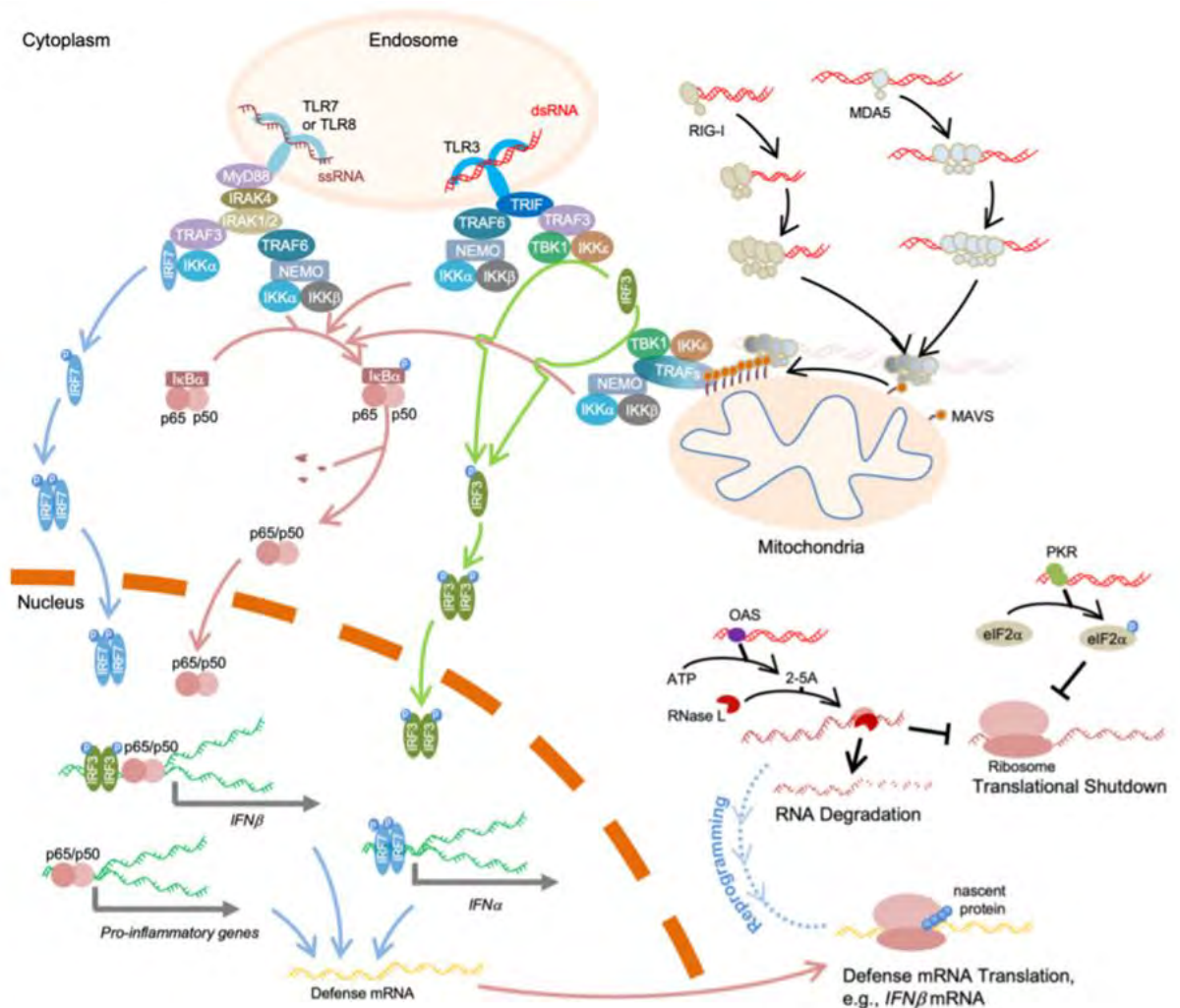


Figure 7: Représentation schématisée de la cascade signalétique induite par le système immunitaire en réponse à l'introduction d'ARNs exogènes dans la cellule. ⁴⁷

3- Optimisation de la stabilité et de la traduction des ARNm IVT

L'optimisation de la stabilité et de la traduction des ARNm implique des interventions sur la structure de l'ARNm, le milieu qui l'entoure et les méthodes de sa production.

a- Optimisation de la structure de l'ARNm

Des efforts considérables ont été fournis pour la modification des éléments structuraux de l'ARNm IVT notamment au niveau de la Coiffe, des régions UTRs, de la région codante et de la queue poly A pour améliorer la stabilité et l'efficacité de traduction. Ceci

participe à la production de quantités significatives de protéines codées sur une période plus longue allant de quelques minutes à plus d'une semaine. ¹

- Coiffe 5'

Une traduction robuste de l'ARNm requiert une structure de la coiffe en 5' robuste. L'ARNm eucaryote a une coiffe de 7 méthylguanosine (m7G) liée à l'ARNm par un pont en 5'-5'- triphosphate (ppp) ce qui donne la structure m7GpppN. La liaison de la coiffe au facteur d'initiation de la traduction 4E « eIF4E » est cruciale pour une traduction efficace tandis que sa liaison aux enzymes DCP1, DCP2 ou DCPS régule la dégradation de l'ARNm. ¹

Une approche pour ajouter la coiffe sur l'ARNm IVT après sa synthèse est d'effectuer une 2^{ème} étape avec des enzymes de coiffage recombinantes dérivées du virus de la Vaccine. La structure résultante est identique à la structure de la coiffe la plus répandue naturellement chez les eucaryotes. Une autre approche communément utilisée consiste en l'ajout d'une coiffe synthétique analogue dans le milieu de la réaction de transcription *in vitro* et le coiffage se fait en une seule étape. La limite de cette approche est la compétition entre la coiffe analogue et le GTP requis pour la réaction qui résulte en une partie de l'ARNm produit qui est sans coiffe et inactive au niveau de la traduction. ^{1,50}

Les premières recherches faites avec de l'ARNm IVT étaient réalisées avec une coiffe en m7GpppG et une grande partie des essais cliniques jusqu'à ce jour utilisent ce type de coiffe. Cependant, une proportion importante de la coiffe m7GpppG s'incorpore dans le mauvais sens d'orientation de l'ARNm et n'est donc pas reconnue par la machinerie de traduction résultant en une activité de traduction plus faible. Par conséquent, il a été introduit les coiffes analogues anti-reverse « ARCA » constituée par exemple de m²7,3'-OGpppG. L'efficacité de traduction s'est alors vue augmentée dans plusieurs types cellulaires. En effet, une O-méthylation sur la Guanosine déjà méthylée permet d'assurer que l'addition d'un nouveau nucléotide ne se fait que sur la Guanosine non-méthylée. Une autre catégorie de coiffe a ensuite été développée en rajoutant une liaison phosphorothioate à la coiffe ARCA. La coiffe analogue résultante confère une résistance au décapping par DCP2 et permet donc d'augmenter la demi-vie de l'ARNm. ^{1,51-53}

- Régions non traduites UTRs

Une autre stratégie pour optimiser la traduction et la stabilité des ARNm IVT dans les cellules est d'incorporer en 3' et 5' des régions non traduites UTRs contenant des éléments identifiés pour moduler la traduction et la stabilité endogène des ARNm. Les meilleurs exemples caractérisant cela sont les 3' UTRs de l' α -Globine et β -Globine qui confèrent une grande stabilité aux ARNm. L'effet stabilisant est dépendant d'éléments riches en pyrimidine phylogénétiquement conservés.⁵⁴ L'effet stabilisant est d'autant plus augmenté en utilisant deux 3' UTR de β -globulines à la suite. Plusieurs autres régions 3' et 5' UTRs cellulaires ou virales optimisent la stabilité et l'efficacité de traduction : La région 3' UTR de l'ARNm codant pour le facteur d'élongation eucaryote 1 α « EEF1A1 » et la région 5' UTR des ARNm des Orthopoxvirus inhibent le décapping et la dégradation 3'-5' par les exoribonucléases.^{1,50}

Pour certaines applications, la déstabilisation des ARNm est requise pour limiter la durée de production des protéines. Cet effet peut être atteint en incorporant des éléments riches en AU dans la région 3' UTR pour assurer une dégradation rapide de l'ARNm et une courte durée d'expression des protéines.^{1,50}

De multiples études ont criblé les UTRs optimaux pour diverses applications. Par exemple, Asrani et al. ont indiqué que le 5'UTR était un facteur clé de l'expression des protéines et dans un crible de dix 5'UTR, ont révélé que les 5'UTR du facteur de complément 3 (C3) et du cytochrome p450 2E1 (CYP2E1) avaient montré l'augmentation la plus importante et la plus constante de l'expression des protéines par rapport à un UTR de référence *in vitro* dans des cellules humaines.⁵⁵ Sample et al. ont récemment construit une bibliothèque de 280000 5'UTR randomisés. Par la suite, ils s'en sont servis pour construire un modèle et pour concevoir de nouveaux 5'UTR capables de diriger le chargement du ribosome et de fournir une traduction optimale.⁵⁶ Les motifs de 3'UTR ont été récemment criblés par Orlandini von Niessen et al, en exploitant une méthode *in vitro* non biaisée où les motifs ont été corrélés avec l'activité de stabilisation de l'ARNm et l'activité de promotion d'une traduction élevée. Ce criblage a révélé que l'utilisation des éléments 3'UTR basés sur les motifs 3'UTR de l'ARNm codant pour l'activateur amino-terminal de la division (AES) et l'ARNr 12S codé par la mitochondrie (mtRNR1) était bénéfique par rapport aux deux 3'UTR de la β -globine humaine précédemment utilisés dans différents systèmes.⁵⁷ Ces éléments 3'UTR ont été récemment exploités dans le vaccin BioNTech/Pfizer contre la COVID-19.⁴⁸

- Queue Poly A

La queue Poly A régule la stabilité et l'efficacité de traduction de l'ARNm en synergie avec la Coiffe. Elle est soit codée directement dans le vecteur matrice à partir duquel l'ARNm est transcrit, soit rajoutée dans un second temps de manière enzymatique en utilisant une polyA polymérase recombinante. La limite de la polyadénylation enzymatique est que chaque préparation d'ARN consiste en un mélange d'ARNm avec différentes longueurs de queue polyA tandis que la transcription *in vitro* d'un vecteur matrice donne une longueur bien définie. Pour les applications cliniques, la méthode enzymatique est préférée. La longueur optimale de la queue poly est entre 120 et 150 nucléotides.^{1,50}

- Région codante

Le remplacement des codons rares par des codons équivalents plus fréquents augmente le rendement de traduction car la réutilisation d'un même ARNt accélère la traduction en raison de l'amino-acylation des ARNt à proximité des ribosomes. L'environnement du codon (nucléotides et codons voisins) influence en grande partie l'élongation. Les codons des mammifères ont généralement les nucléotides G ou C en troisième position, et de telles séquences sont exprimées plus efficacement que celles dans lesquelles les codons se terminent par A ou T.¹ Sur des essais cliniques réalisés par CureVac dans le cadre de la mise en place de la vaccination anti cancéreuse, le remplacement des U en 3^{ème} position sur les codons par des G ou C a montré une augmentation de 5 fois l'expression des protéines codées comparée aux codons non optimisés.⁵⁰

Généralement, les optimisations de codons sont réalisées en comparant la production de protéines à partir de plasmides d'ADN portant la séquence de type sauvage à la séquence optimisée. Dans ce contexte, il est difficile de déterminer si l'augmentation de l'expression protéique de la construction optimisée par codon est due à une transcription accrue, à une stabilité accrue de l'ARN ou à une traduction plus importante. Cependant, les études qui ont directement comparé l'optimisation des codons qui optimise l'utilisation de l'ARNt et supprime la structure secondaire de l'ARN, les motifs d'épissage potentiels et d'autres séquences de type sauvage dans l'ARNm ont trouvé de petites augmentations (~1,6 à 3 fois) de la protéine produite.⁵⁰

Quelquefois, il peut y avoir des raisons de s'abstenir d'utiliser des codons optimisés. En effet, certaines protéines nécessitent pour leur repliement correct, une traduction lente qui est assurée par des codons rares.¹

- Nucléosides

Bien que le concept de l'ARNm ait été introduit depuis plus de 25ans, il n'a pas connu au début un grand succès du fait de la forte immunogénicité des ARNm et de son instabilité. Pendant de nombreuses années le concept a été mis de côté jusqu'à ce qu'il y ait un rebondissement avec la découverte clé de Karikó et son équipe en 2005 des nucléosides modifiés qui ont boosté l'efficacité et la sécurité des ARNm. Les ARNm à nucléosides modifiés sont moins immunogènes comparés aux ARNm non modifiés. L'étude a montré que l'incorporation des nucléosides modifiés 5-méthylcytosine (m5C), 6-méthyladénosine (m6A), 5-méthyluridine (m5U), 2-thiouridine (s2U) ou la pseudo-uridine (Ψ), réduisait significativement l'immunogénicité médiée par les TLRs.^{48,58} Ces modifications seraient un marquage de l'ARNm comme ARNm du soi et le protège donc de la reconnaissance immunitaire innée.⁵⁹

Il a été démontré par la suite que la modification (Ψ) en particulier augmentait la capacité de traduction et la stabilité biologique de l'ARNm. Il a été démontré ensuite que la capacité de traduction accrue de l'ARN modifié Ψ était favorisée par : une diminution de l'activation de la protéine kinase R (PKR) par l'ARNm modifié et une réduction de la phosphorylation de la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la traduction eucaryote (eIF2 α) médiée par PKR, une activation réduite de la 2'-5'-oligoadénylate synthétase (OAS) par l'ARNm modifié, une activation réduite de la 2'-5'-oligoadénylate médiée par la RNase L et une résistance accrue de l'ARNm modifié à la dégradation médiée par la RNase L.⁵⁸

Andries et al. ont testé la traduction et l'immunogénicité *in vitro* et *in vivo* chez la souris et ont constaté que l'ARNm incorporé avec la 1-méthylpseudouridine (m1 Ψ) est plus performant que celui incorporé avec la Ψ . En raison de sa capacité à réduire de manière significative la probabilité de fortes réactions immunitaires et à augmenter l'efficacité, le m1 Ψ est devenu aujourd'hui la modification d'ARN la plus couramment utilisée pour diverses applications LNP-ARNm : vaccins, anticorps thérapeutiques ou remplacement de protéines par ARNm. Par exemple, le vaccin BioNTech/Pfizer ainsi que le vaccin Moderna contre la COVID-19 utilisent des ARNm modifiés contenant la m1 Ψ .⁴⁸

Il est important de noter qu'à ce jour, les raisons pour lesquelles certaines modifications sont plus efficaces que d'autres pour empêcher une réaction immunitaire contre les ARNm ne sont pas exactement claires. De plus, différentes cellules peuvent avoir différentes sensibilités vis-à-vis des nucléosides modifiés. Par exemple, les ARNm transcrits *in vitro* contenant s2U et m6A et transfectés dans les cellules HEK293 (une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines immortelles) et les cellules dendritiques dérivées de monocytes murins (MDDC) ne sont pas traduits.⁶⁰ En outre, ψ et m1 ψ n'ont pas pu améliorer la traduction des ARNm transcrits *in vitro* dans les cellules HeLa (une lignée cellulaire humaine immortelle de cancer du col de l'utérus) ou dans les kératinocytes (une lignée cellulaire épidermique), mais elles ont pu améliorer la traduction des ARNm transcrits *in vitro* et transfectés dans les cellules C2C12 (une lignée cellulaire immortalisée de myoblastes de souris).⁵⁸

Ces observations suggèrent que l'effet de la modification de l'ARN sur l'immunogénicité et la suppression de la traduction n'est peut-être pas entièrement dû à l'effet direct des nucléosides modifiés sur les capteurs ARN. Une récente étude menée par Xin Mu et Sun Hur a révélé que les nucléotides modifiés dans la réaction IVT modifient également le comportement de l'ARN polymérase et par conséquent les produits ARN synthétisés. Ils ont testé des nucléotides modifiés pour la transcription des ARNm et ont constaté que les sous-produits d'ARNdb médiés par l'antisens étaient réduits lorsque ψ , m1 ψ ou m5C étaient utilisés mais pas lorsque m6A était utilisé.⁴⁹ Une observation similaire a été faite par Karikó et al. lorsque ψ a été utilisé à la place de U.⁶¹

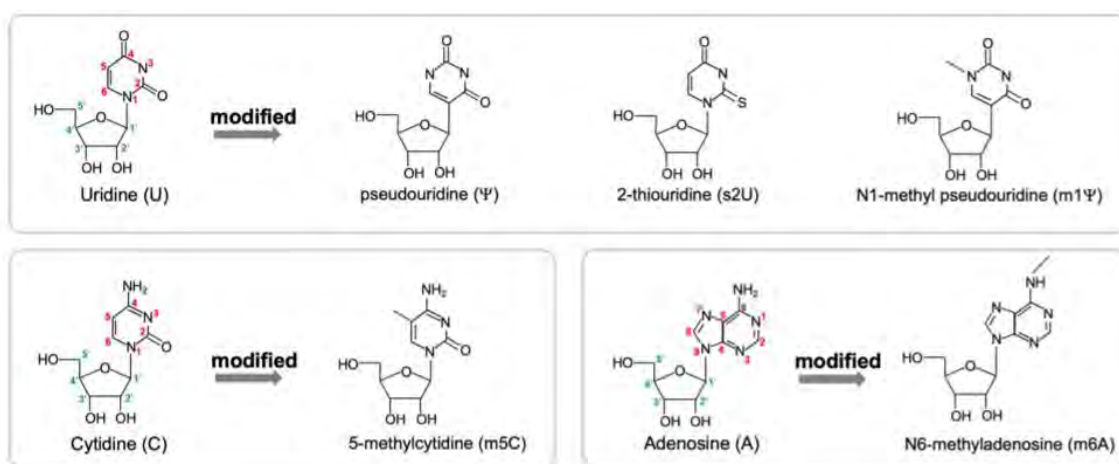


Figure 8: Structures des nucléotides non modifiés et leurs versions chimiquement modifiées⁴⁹

b- Optimisation de l'administration

L'optimisation de l'administration est en fait l'optimisation du véhicule transportant l'ARNm jusqu'au cytosol des cellules cibles. Comme vu précédemment, le moyen le plus efficace et le plus utilisé qui existe aujourd'hui est basé sur les LNP. Les LNP ont également un grand potentiel pour améliorer de manière significative la sécurité et l'efficacité des thérapies basées sur les LNP-ARNm.

L'optimisation de la composition des LNP-ARNm comprend la variation des ratios de lipides ou des ratios lipides-ARNm. Afin d'optimiser les LNP pour la livraison d'ARNm au foie, Kaufmann et al. ont développé une méthodologie de conception d'expériences (DOE). En augmentant les rapports pondéraux lipide ionisable/ARNm et en incorporant la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) comme co-lipide, les auteurs ont augmenté de manière significative l'efficacité des LNP chargés d'ARNm d'érythropoïétine par rapport aux LNP-ARNm témoins. Sago et al. ont formulé de multiples bibliothèques de LNP (au total >250 LNP) en faisant varier le composé amino-lipidique, la quantité molaire et la structure du PEG, ainsi que la quantité molaire de cholestérol. Ils ont testé la transfection des différents LNP *in vivo* en se basant sur la traduction de l'ARNm de la Cre en protéine Cre et sur l'isolement de cellules fluorescentes où l'ADN ciblé a été édité par la protéine Cre. Cette approche a permis d'identifier deux nouvelles LNP qui délivrent efficacement l'ARNm aux cellules endothéliales. Cette étude a montré l'importance de l'optimisation de la composition des LNP non seulement pour améliorer leur efficacité mais aussi pour identifier des LNP avec de nouveaux tropismes. Le criblage a contribué à la facilitation de la formulation des ARNm-LNP et à leur optimisation.

62,63

La localisation dans des tissus particuliers et le ciblage actif des thérapies LNP-ARNm vers des types de cellules et des organes spécifiques est un sujet d'intérêt particulier qui peut diminuer les effets hors cible et ouvrir la voie à des applications dans des tissus difficiles à cibler. Tout d'abord, la localisation sur des tissus particuliers peut être obtenue par une optimisation au niveau de l'ARNm en introduisant des sites cibles de miARN spécifiques à un type de cellule dans la région 3'UTR, ce qui entraîne la dégradation de l'ARNm et la perte d'efficacité de la traduction de l'ARNm-LNP dans certains types de cellules.⁴⁸

L'optimisation du ciblage au niveau des LNP est basée sur la modification des composants structuraux des LNP et sur l'utilisation de surface fonctionnalisée, par exemple, avec des ligands ou des anticorps de ciblage. La plupart des LNP actuellement développées se localisent en grande partie dans le foie par le biais de l'absorption médiée par l'apolipoprotéine E (ApoE).⁴⁸ Grâce au criblage il a également été possible d'étudier différentes combinaisons sur différents tissus cibles et ainsi définir les LNPs optimales pour chaque tissu sans passer par des ligands de ciblage. Par exemple Sago et al. ont permis de trouver des LNP 7C2 et 7C3 qui ciblent efficacement les cellules endothéliales ⁶³

Si, malgré l'optimisation de l'ARNm et des LNP, des composants de l'ARNm-LNP présentant des caractéristiques immunostimulantes indésirables persistent, une autre possibilité pour les supprimer et réduire les effets indésirables potentiels est l'incorporation de corticostéroïdes puissants directement dans le produit pharmaceutique ARNm-LNP. Chen et al. ont incorporé de la dexaméthasone, un corticostéroïde puissant, dans la nanoparticule LNP contenant différents types d'acides nucléiques. Ils ont utilisé des liants biodégradables pour conjuguer chimiquement des fragments acyles/alkyles lipophiles à la dexaméthasone et ont synthétisé des promédicaments de la dexaméthasone qui pouvaient être efficacement incorporés dans les LNP. L'utilisation de LNP-ARNm contenant 10 % en moles de dexaméthasone a fortement réduit la stimulation immunitaire, entraînant une diminution significative de l'IL-6, TNF α , IL12p70, IL-1 β , IL-10 et du chimioattractant KC/GRO dans le plasma, 4 heures après l'injection i.v. chez les souris. Il est intéressant de noter que l'effet immunosuppresseur de la dexaméthasone incorporée était significativement plus élevé que celui de la dexaméthasone libre qui était coadministrée avec le LNP-ARNm thérapeutique.⁶⁴ D'autres stratégies visant à prévenir une immuno-stimulation indésirable potentielle par les ARNm-LNP consistent à utiliser d'autres petites molécules ou des ARNsi contre les médiateurs clés de la réponse immunitaire innée. Cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs de l'immunité innée n'a été établie que dans de rares cas spécifiques, ce qui indique les difficultés potentielles d'une application plus large et la nécessité d'études supplémentaires.⁴⁸

V- Processus de fabrication des ARNm IVT

1- Synthèse de l'ARNm

La première étape de fabrication des ARNm IVT est le séquençage de l'ADN correspondant au gène codant la protéine d'intérêt. Généralement cette séquence est obtenue après reverse transcription de l'ARNm correspondant afin de ne conserver que les exons (ADNc). Cet ADNc est ensuite cloné dans un plasmide pour donner la matrice ADN de départ. Pour la synthèse de l'ARNm, cet ADN plasmidique linéaire sera utilisé pour une transcription dans un système acellulaire.²¹

L'ARNm synthétique contient un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une protéine, flanqué au minimum de deux éléments essentiels à la fonction de l'ARNm eucaryote mature : une "coiffe", c'est-à-dire un résidu 7-méthyl-guanosine joint à l'extrémité 5' via un 5'-5' triphosphate, et une queue poly(A) à l'extrémité 3'. Par conséquent, une matrice d'ADNp pour la transcription *in vitro* contient au moins un promoteur de bactériophage, une ORF, éventuellement une séquence polyT transcrite en poly(A) et un site de restriction unique pour la linéarisation du plasmide afin d'assurer une terminaison définie de la transcription (la coiffe n'est pas codée par la matrice).⁵²

La matrice ADNp linéarisée est transcrite en ARNm dans un mélange contenant de l'ARN polymérase recombinante (T7, T3 ou SP6) et des nucléosides triphosphates. Il est possible d'obtenir un ARNm coiffé par transcription. À cette fin, un analogue de coiffe comme le dinucléotide m7G(5')ppp-(5')G peut être inclus dans la réaction. Si l'analogue de coiffe est en excès par rapport au GTP, la transcription s'initie avec l'analogue de coiffe plutôt qu'avec le GTP, ce qui donne un ARNm coiffé. Alternativement, la coiffe peut être ajoutée enzymatiquement après la transcription. Une queue poly(A) peut également être ajoutée après la transcription si elle n'est pas fournie par la matrice d'ADNp comme vu précédemment.^{52,65}

Après la transcription, la matrice d'ADNp ainsi que l'ADN bactérien contaminant sont digérés par la DNase.

2- Purification de l'ARNm

À ce stade, l'échantillon contient la transcription de l'ARNm désiré au sein d'un mélange complexe comprenant divers nucléotides, des oligodésoxynucléotides, de courtes transcriptions abortives provenant de cycles abortifs pendant l'initiation de la transcription, ainsi que des protéines. Ces contaminants peuvent être éliminés de l'échantillon par une combinaison d'étapes de précipitation et d'extraction.

Cependant, l'échantillon comprend des espèces d'ARN contaminantes supplémentaires qui ne peuvent pas être séparées du transcrit attendu par des moyens simples : Les transcrits plus courts que prévu résultent d'une terminaison prématurée pendant l'élongation, les transcrits plus longs que prévu proviennent de matrice d'ADN linéarisée par une enzyme qui laisse un débordement en 3' ou de traces d'ADN matrice non linéarisé. Des transcrits indésirables sont également produits en raison de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante des polymérases de bactériophages telle que la polymérase T7. Par conséquent, pour être utilisé comme substance médicamenteuse, l'ARNm devra être purifié davantage pour éliminer ces transcrits contaminants.⁶⁶

Une seule étape chromatographique qui sépare l'ARNm en fonction de sa taille a permis d'éliminer les transcrits les plus courts et les plus longs, ce qui a donné un ARNm pur et unique. La mise en œuvre d'une telle purification chromatographique dans le cadre d'un processus de production d'ARNm conforme aux BPF a multiplié l'activité des molécules d'ARNm en termes d'expression des protéines *in vivo*.⁵²

Une purification rigoureuse de l'ARNm aboutit à une augmentation de l'expression protéique. Ceci est dû à l'élimination notamment des ARNdb produits et qui sont fortement immunogènes car ils activent les capteurs immunitaires innés réduisant ainsi l'expression protéique. Les sous-produits ARNdb sont principalement produits par l'extension 3' du transcrit d'ARNsb, causée par l'annexion de l'extrémité 3' à des séquences complémentaires en cis ou en trans et par la poursuite de la transcription.⁴⁹

3- Optimisation de la fabrication

En dehors des méthodes d'optimisation de la stabilité et du pouvoir traductionnel des ARNm IVT vus précédemment et qui concernent surtout la structure de l'ARNm à produire, il a fallu s'intéresser à la méthodologie de fabrication pour diminuer la production des sous-produits immunostimulants.

Les méthodes traditionnelles de purification, y compris l'extraction phénol/chloroforme, la précipitation au chlorure de lithium et les méthodes de purification sur colonne, ne peuvent pas distinguer les ARNdb des ARNsb, et les ARN courts abortifs ne sont pas toujours éliminés.⁴⁹

- ARN polymérase :

La transcription *in vitro* peut être réalisée à des températures élevées (51-55 °C) en utilisant une ARN polymérase T7 thermostable modifiée pour obtenir des produits ARNsb sans sous-produits ARNdb dérivés de l'extension à partir de l'extrémité 3'. Il est suggéré que des températures plus élevées diminuent l'efficacité de la liaison de la polymérase à l'extrémité 3' de l'ARN ou l'amorçage de l'extrémité 3' pour la synthèse antisens. Il est intéressant de noter que cette condition de température élevée n'a pas pu réduire la formation du sous-produit d'ARNdb formé par l'hybridation des ARN sens et antisens. Cependant, l'introduction de la queue poly(A) codée par la matrice a réduit la formation du sous-produit antisens à des températures plus élevées. Ainsi, une combinaison de température élevée et de queue poly(A) transcrite à partir de la matrice a été proposée pour réduire l'immunogénicité.⁶⁷

Les ARN polymérases d'autres bactériophages ont également été étudiées. Une ARN polymérase provenant du phage psychrophile VSW-3 s'est avérée plus efficace que l'ARN polymérase T7 pour garantir un bon rendement des produits d'ARNsb et diminuer le rendement des sous-produits d'ARNdb. Les réactions peuvent être réalisées à une température ≤ 25 °C, ce qui serait bénéfique pour la stabilité des produits ARN.⁶⁸

- Conditions de transcription *in vitro* :

Différentes conditions pour la transcription *in vitro* ont été testées, telles que les concentrations d'ARN polymérase, de matrice, de NTP et de NaCl, pour diminuer la formation d'ARNdb et il a été constaté que la diminution de la concentration de Mg²⁺ (de 30 à 5 mM)

réduisait la quantité de sous-produits d'ARNdb générés grâce au mécanisme de synthèse d'ARN antisens sans promoteur initiée du côté 3' de l'ADN. Bien que la raison de cette amélioration ne soit pas claire, il est supposé que l'ARN polymérase T7 dans la synthèse d'ARN antisens sans promoteur maintient sa conformation dans la phase d'élongation pour rester transcriptionnellement active et qu'une concentration élevée de Mg²⁺ favorise le maintien d'une telle conformation.⁶⁹

- Purification :

Sur la base de la taille et de la structure de l'ARN, l'électrophorèse en gel de PAGE ou d'agarose natif peut identifier les bons produits d'ARNsb à petite échelle. Pour de plus grandes quantités d'ARN transcrits *in vitro*, la purification chromatographique sépare efficacement les sous-produits, tels que les courts transcrits abortifs, les nucléotides et les ARNdb avec des conformations distinctes. Il a été signalé que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) éliminait efficacement les contaminants d'ARNdb. L'utilisation d'une combinaison de nucléotides modifiés et la purification par HPLC peut produire des ARNm non immunostimulants.⁷⁰

Une autre approche de purification simple, rapide et peu coûteuse pour éliminer les contaminants d'ARNdb est basée sur la liaison sélective de l'ARNdb à la cellulose dans un tampon contenant de l'éthanol. La purification est réalisée grâce à des colonnes de centrifugation remplies de cellulose. Conformément aux résultats de la purification par HPLC, les ARNm transcrits *in vitro* purifiés par cellulose et contenant des nucléosides non modifiés étaient immunostimulants, alors que les ARNm transcrits *in vitro* contenant des m¹ψ ne l'étaient pas, ce qui souligne le rôle protecteur des nucléosides modifiés. Les résultats des essais *in vivo* ont démontré que les ARNm purifiés par cette méthode sont comparables aux ARNm purifiés par HPLC.⁶¹

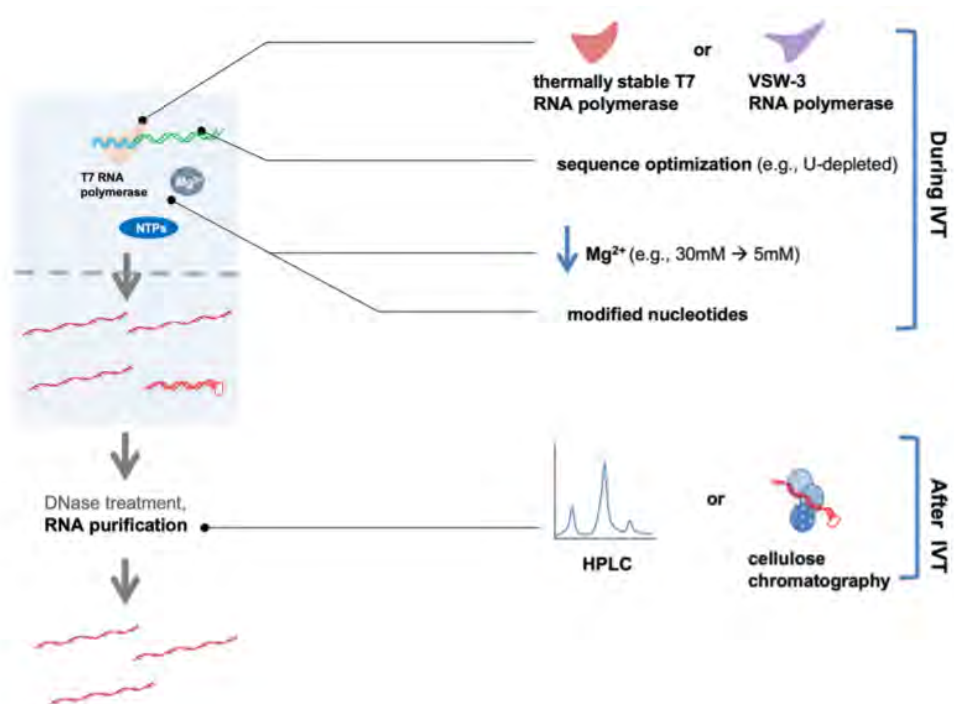


Figure 9: Méthodes d'optimisation de la transcription in vitro.⁴⁹

Partie 2 : Applications des ARNm IVT en prévention et en thérapie

Les innovations technologiques permettant la stabilisation des ARNm tout en réduisant leur toxicité ont motivé l'exploration des potentialités thérapeutiques de l'ARNm IVT pour un large éventail d'applications. Ces potentialités ont été évaluées dans de nombreuses études précliniques et cliniques.

Les principaux domaines thérapeutiques pour lesquels les médicaments à ARNm sont actuellement explorés sont les immunothérapies, la vaccinologie, les thérapies de remplacement des protéines et la médecine régénérative. Après avoir présenté ces différentes applications nous dresserons un état des lieux des essais cliniques menés dans le cadre de thérapies à ARNm. Ces informations sont issues de la consultation du site ClinicalTrials.gov qui représente une base de données des études cliniques menées dans le monde entier.

L'identification de ces essais cliniques a pour but de souligner les avancées réalisées dans le domaine des thérapies à ARNm pour chaque application. La méthodologie d'extraction des données est décrite en annexe 2.

I- Les vaccins à ARNm

Le vaccin à ARNm est une technologie nouvellement développée qui combine la biologie moléculaire et l'immunologie. Des ARNm codant pour des antigènes sont transfectés dans des cellules somatiques pour synthétiser ces antigènes par le système d'expression cellulaire. Les antigènes induisent alors une réponse immunitaire.⁷¹

Au cours des dernières décennies, de nouvelles recherches et l'amélioration des techniques expérimentales ont permis de progresser en matière de sécurité, d'efficacité et de production industrielle de vaccins à ARNm. Ces avantages font des vaccins à base d'ARNm une priorité dans le traitement des tumeurs et des maladies virales. Les vaccins à ARNm sont sûrs pour induire des anticorps chez l'homme. Cela s'explique par le fait que l'ARNm n'est pas un vecteur de réplication, que ce dernier ne présente pas de risque d'intégration génomique ni

de fortes réponses immunogènes. De plus, les nucléases dégradent rapidement l'ARN monocaténaire.^{71,72}

1- Domaines d'application

La vaccination est l'approche médicale la plus efficace en matière de prévention et de contrôle des maladies. Le développement et l'utilisation réussis des vaccins ont permis de sauver des millions de vies et d'économiser des sommes considérables. À l'avenir, les vaccins pourraient être utilisés non seulement contre les maladies infectieuses, mais aussi contre le cancer, en tant qu'outil de prophylaxie et de traitement, et pour l'élimination des effets d'allergènes.⁷³

a- Infectiologie

Les vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses peuvent être développés à des fins prophylactiques ou thérapeutiques. Les vaccins à ARNm exprimant l'antigène d'un pathogène infectieux induisent des réponses immunitaires humorales et cellulaires fortes et puissantes. La procédure de production des vaccins à ARNm est entièrement acellulaire, simple et rapide si elle est comparée à la production de vaccins à pathogène entier, vivants atténués ou sous-unitaires.⁷³ . Par exemple, un bioréacteur de 5 litres peut produire près d'un million de doses de vaccin à ARNm en une seule réaction. En outre, un seul ARNm peut coder pour plusieurs antigènes, ce qui renforce la réponse immunitaire contre les agents pathogènes résistants et permet de cibler plusieurs pathogènes ou variantes virales avec une seule formulation.⁷⁴

Ce processus de fabrication simple et rapide fait de l'ARNm un bioproduit prometteur qui peut potentiellement combler le fossé entre les maladies infectieuses émergentes et le besoin désespéré de vaccins efficaces.⁷³

Les vaccins contre les maladies infectieuses constituent actuellement l'application la plus avancée des thérapies à base d'ARNm. La majorité des vaccins à ARNm en cours d'essais précliniques et d'utilisation clinique sont administrés sous forme d'injection en bolus dans la peau, les muscles ou l'espace sous-cutané, où ils sont absorbés par des cellules immunitaires

ou non immunitaires et traduits en antigènes. Les antigènes sont alors présentés aux lymphocytes T et B. Il est à noter que la structure de l'ARNm et le choix du véhicule d'administration améliorent l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins à ARNm.⁷⁴

b- Cancérologie

La vaccination contre le cancer consiste à induire des réponses des cellules T spécifiques de la tumeur, potentiellement capables de rejeter la tumeur, en fournissant des antigènes cancéreux dans un contexte d'immunostimulation. Certains vaccins anticancéreux ciblant des antigènes exposés en surface peuvent également induire une réponse des lymphocytes B spécifique de la tumeur. Les antigènes sont soit des auto-antigènes associés à la tumeur (TAA), tels que les antigènes de différenciation et les antigènes surexprimés, soit des antigènes véritablement spécifiques de la tumeur (TSA) non soumis à la tolérance immunitaire, tels que les néo-antigènes viraux et ou les antigènes issus de la dégradation de protéines mutées. Les vaccins à ARNm codent la séquence complète ou partielle d'un TSA ou d'un TAA préalablement identifié à partir d'une biopsie tumorale, et ne dépendent pas de l'identification préalable de l'haplotype de l'antigène leucocytaire humain (HLA) d'un patient ou de la prédiction des épitopes.⁷⁵

Sahin et ses collègues ont été les premiers à utiliser l'ARNm codant pour des néo-épitopes afin d'induire une réponse immune anti tumorale (vaccination contre le cancer). Ils utilisent le séquençage à haut débit pour identifier chaque mutation somatique unique de l'échantillon de tumeur d'un patient, appelée « mutanome ». Cela permet de concevoir rationnellement des vaccins anticancéreux néo-épitopiques en fonction du patient, et présente l'avantage de cibler des spécificités antigéniques du non-soi. La preuve du concept a été apportée récemment : Kreiter et ses collègues ont découvert qu'une partie importante des mutations cancéreuses non synonymes étaient immunogènes lorsqu'elles étaient transmises par l'ARNm et étaient principalement reconnues par les cellules T CD4+. Sur la base de ces données, ils ont généré une méthode informatique permettant de prédire les néo-épitopes restreints par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qui peuvent être utilisés comme immunogènes vaccinaux. Les vaccins ARNm codant pour ces néo-épitopes permettent de contrôler la croissance tumorale.⁷⁶

Le rôle des vaccins à ARNm en cancérologie permet donc de réduire la charge tumorale, de prévenir la dissémination métastatique ainsi que la récurrence.

c- Allergologie

L'immunothérapie spécifique de l'antigène est la seule modalité de traitement des maladies allergiques de type I médiées par les immunoglobulines E (IgE). La modulation du type de réponse des cellules T et l'induction d'anticorps IgG qui entrent en compétition avec les anticorps IgE pour leurs sites de liaison sur les allergènes sont les principaux modes d'action d'une immunothérapie efficace.⁷⁷

L'identification moléculaire des antigènes cibles d'hypersensibilité les plus courants a ouvert la voie aux approches de vaccins recombinants. Dans les modèles précliniques, les vaccins génétiques à base d'ADN se sont avérés antagonistes des mécanismes d'allergie en induisant des réponses immunitaires des cellules T de type TH1 qui ont supprimé la production d'IgE spécifiques des allergènes. Cependant, l'application clinique des vaccins antiallergiques à base d'ADN est entravée par des considérations de sécurité. Il a été démontré que l'ADN injecté persistait pendant 2 semaines et pouvait se propager à partir du site d'injection vers des tissus immunitaires et non immunitaires dans tout le corps, posant ainsi le risque d'induire des effets secondaires anaphylactiques graves. À cet égard, les approches basées sur l'ARNm IVT peuvent être avantageuses car l'ARNm IVT subit une dégradation rapide dans l'espace extracellulaire et peut être conçu pour avoir une courte demi-vie intracellulaire. Associé à la forte capacité immunostimulante TH1 de l'ARNm, il pourrait être mieux adapté que l'ADN au développement d'un vaccin contre l'allergie. Dans un modèle murin de rhinite allergique, l'injection intradermique d'ARNm IVT avant la sensibilisation à l'antigène a induit des réponses immunitaires durables de type TH1 spécifiques de l'allergène. Ces réponses ont protégé les souris contre l'induction d'IgE spécifiques aux allergènes et ont inhibé l'inflammation pulmonaire médiée par l'exposition aux allergènes.⁷⁷⁻⁷⁹

Ce concept diffère de l'immunothérapie conventionnelle puisqu'il repose sur une déviation immunitaire vers un phénotype TH1 plutôt que sur l'induction de lymphocytes T régulateurs ou de tolérance.⁷⁹

Au cours de la dernière décennie, l'augmentation rapide de l'incidence mondiale et la dimension épidémique des maladies allergiques ont suscité un débat sérieux sur les approches

de vaccination prophylactique spécifique aux allergènes. « L'hypothèse de l'hygiène » a montré qu'un amorçage précoce du système immunitaire par le TH1 est la clé de la prévention des maladies atopiques. La vaccination contre un panel d'allergènes majeurs (adaptés aux besoins régionaux) qui présentent une forte réactivité croisée permettrait d'induire un large éventail d'amorçages TH1 spécifiques des allergènes chez les individus ayant une prédisposition génétique à l'allergie. Il a été observé dans de nombreuses expériences que même un amorçage TH1 très faible (spécifique de l'allergène) est efficace pour prévenir la sensibilisation aux allergènes car, une fois induites, les cellules mémoire TH1 sont réactivées et développées par un contact ultérieur avec l'allergène, ce qui rappelle et renforce le biais TH1. Traduit dans un contexte clinique, cela signifie que même une mémoire TH1 subtile serait prolongée et renforcée par une exposition naturelle ultérieure à l'allergène concerné.^{78,80}

Les formulations actuelles utilisées en clinique pour l'immunothérapie spécifique ne sont très probablement pas applicables à de telles approches prophylactiques, car elles n'ont pas un composant inducteur de TH1 suffisant et, dans le pire des cas, elles pourraient sensibiliser un individu sain à un allergène.⁷⁸

2- Méthodes d'immunisation

a- Injection de cellules dendritiques transfectées *ex vivo*

Le mécanisme des vaccins utilisant cette méthode repose sur l'expression de l'antigène codé par l'ARNm par les cellules dendritiques « DC ». Cet antigène est dégradé dans la cellule en peptides antigéniques qui seront présentés par les molécules du système CMH de classe I et le CMH de classe II pour l'activation des cellules T CD8+ et CD4+, respectivement. Les DC peuvent également présenter l'antigène intact aux cellules B, ce qui entraîne une réponse humorale.⁸¹

La transfection des DC avec de l'ARNm est le plus souvent effectuée *ex vivo* après leucaphérèse réalisée sur le propre échantillon de sang du patient. Les DC sont isolées puis transfectées avec l'ARNm codant pour l'antigène et réadministrées dans l'organisme. Bien que cette technique permette de contrôler étroitement le chargement de l'ARNm dans la cellule

d'intérêt, elle est considérée comme trop coûteuse et trop laborieuse pour une approche thérapeutique potentielle.⁸¹

b- Injection directe d'ARNm IVT *in vivo*

Une autre méthode d'immunisation par ARNm est l'injection directe *in vivo* de transcrits codant pour un antigène, par différentes voies d'administration : intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique ou intranodale, visant toutes à transfecter les CPA, principalement les DC, *in vivo* pour initier la production et la présentation de l'antigène cible. Cette immunisation s'est révélée efficace, en particulier lorsque l'injection est localisée dans les ganglions lymphatiques ou la peau où les CPA sont plus abondantes.⁷⁶

3- Réponse immunitaire aux protéines codées par l'ARNm IVT

Une fois l'ARNm transfecté dans les cellules immunitaires ou non immunitaires il peut être traduit en protéines (antigènes). Ces antigènes sont ensuite présentés aux Lymphocytes B et T. Ci-dessous la réponse immunitaire aux antigènes dans les CPA (Figure 10) ⁷⁴:

- (1) Les vaccins à ARNm injectés sont endocytés par les cellules présentatrices d'antigènes.
- (2) Après s'être échappé de l'endosome et avoir pénétré dans le cytosol, l'ARNm est traduit en protéine par le ribosome. La protéine antigénique traduite peut stimuler le système immunitaire de plusieurs façons.
- (3) L'antigène intracellulaire est dégradé en fragments plus petits par le complexe protéasome, et les fragments sont présentés à la surface cellulaire aux cellules T cytotoxiques par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1.
- (4) Les cellules T cytotoxiques activées tuent les cellules infectées en sécrétant des molécules cytolytiques, telles que la perforine et la granzyme.
- (5) Les antigènes sécrétés peuvent être absorbés par les cellules, dégradés à l'intérieur des endosomes et présentés à la surface cellulaire aux cellules T auxiliaires par des protéines du CMH de classe II.

(6) Les lymphocytes T auxiliaires facilitent l'élimination des agents pathogènes en circulation en stimulant les lymphocytes B pour qu'ils produisent des anticorps neutralisants IgG et en activant les phagocytes, tels que les macrophages, par le biais de cytokines inflammatoires.

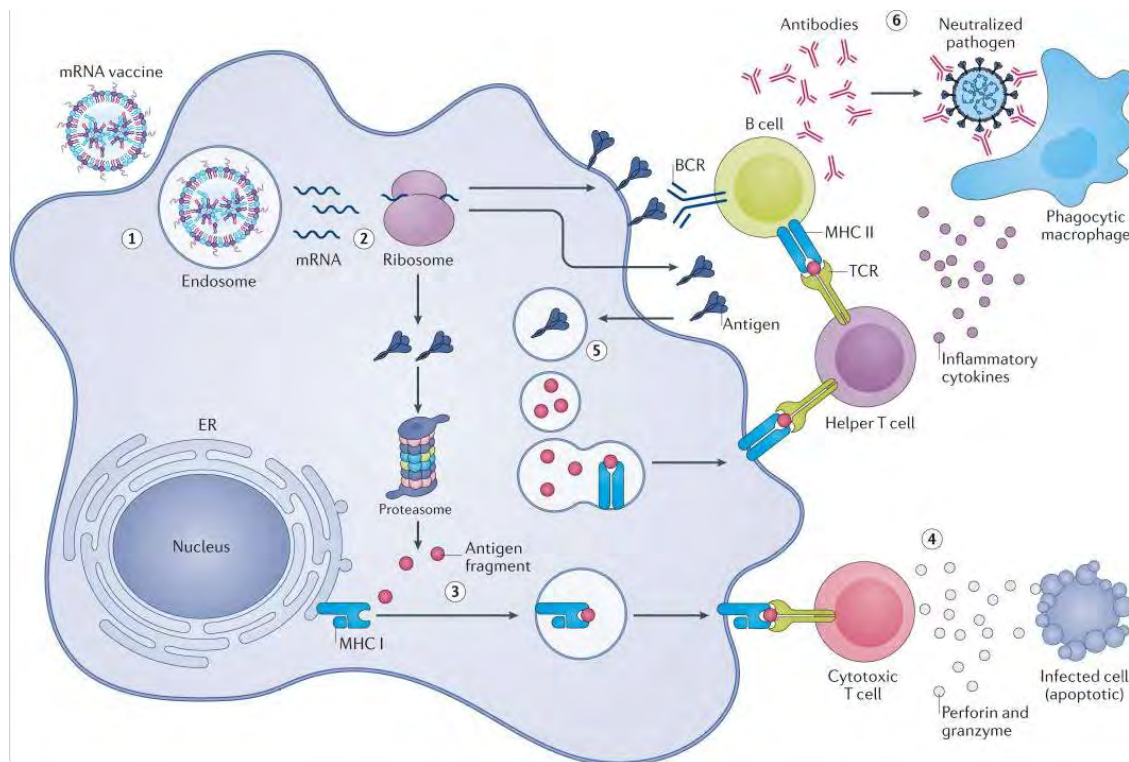


Figure 10: Réponse immunitaire d'une CPA à la transfection par un vaccin à ARNm.⁷²

Le mécanisme de protection conféré par les vaccins à ARNm repose sur les anticorps sériques IgG neutralisants et les Lymphocytes T CD4 + et CD8+.⁸²

4- Vaccins ARNm et adjuvants

a- Pouvoir adjuvant de l'ARNm

Les vaccins à base d'ARNm ont des propriétés adjuvantes intrinsèques en raison de leur reconnaissance par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) (des récepteurs endosomaux de type Toll (par exemple TLR7, TLR8) et des capteurs cytoplasmiques (par exemple, RIG-I ou MDA-5)) et de l'induction de réponses immunitaires innées comme

décrites précédemment dans la partie « Immunogénicité des ARNm IVT ». Ce pouvoir adjuvant est essentielle pour la maturation des cellules dendritiques (DC) afin de favoriser l'induction de réponses immunitaires adaptatives ultérieures.^{21,83}

b- Vaccins ARNm avec adjuvants

Les propriétés immunostimulantes de l'ARNm peuvent toutefois être accrues par l'inclusion d'un adjuvant afin d'augmenter la puissance de certains formats de vaccins à ARNm. Il s'agit d'adjuvants traditionnels ainsi que de nouvelles approches qui tirent parti de l'immunogénicité intrinsèque de l'ARNm ou de sa capacité à coder des protéines immunomodulatrices. Les vaccins à ARN auto-répliqués ont montré une immunogénicité et une efficacité accrues après avoir formulé l'ARN dans une nanoémulsion cationique basée sur l'adjuvant autorisé MF59 (développé par Novartis).⁷⁶ Le MF59 est une nanoémulsion qui consiste en un noyau huileux de squalène stabilisé par une enveloppe lipidique qui adsorbe l'ARNm à sa surface. Le MF59 provoque la sécrétion de chimiokines par les cellules du site d'injection, ce qui recrute les cellules présentatrices d'antigènes, induit la différenciation des monocytes en cellules dendritiques et améliore l'absorption de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes. Le mécanisme par lequel les nanoémulsions cationiques à base de squalène s'échappent des endosomes pour délivrer l'ARNm dans le cytoplasme reste peu clair.⁷⁴

Il a également été démontré que le type de véhicule d'ARNm et la taille du complexe ARNm-véhicule modulent le profil de cytokine induit par la transfection de l'ARNm. Par exemple, la plateforme vaccinale RNActive[®] (CureVac AG) dépend de son véhicule pour fournir une activité adjuvante. Dans ce cas, l'antigène est exprimé à partir d'un ARNm nu, non modifié et dont la séquence est optimisée, tandis que l'activité adjuvante est assurée par un ARNm co-délivré complexé avec de la protamine et qui agit via la signalisation TLR7. Ce format de vaccin a suscité des réponses immunitaires favorables dans de nombreuses études précliniques sur des animaux pour la vaccination contre le cancer et les maladies infectieuses.^{21,76,84}

Dans le domaine des maladies infectieuses, des stratégies d'adjuvants spécifiques ont été testées pour favoriser l'activation immunitaire sans bloquer l'expression de l'ARNm. L'une de ces stratégies consiste à co-formuler des ARNm modifiés par des nucléosides avec du

Monophosphoryl lipide A « MPLA », un agoniste de TLR-4. L'utilisation de nucléosides modifiés nuit à la réponse IFN de type I observée dans les tests d'ARNm à base de nucléosides non modifiés, tandis que le MPLA permet une meilleure induction de l'activation des lymphocytes T à travers l'activation du TLR4.⁸⁵

Une stratégie plus récente a consisté à développer de courtes régions à double brin dans la queue poly-A ou l'UTR 3' de l'ARNm. L'hybridation d'un ARN poly-U court à l'ARNm ne diminue pas de manière substantielle l'efficacité de la traduction du transcrit dans les DC. Par rapport à l'ARNm seul, le transcrit poly-A/poly-U induit des taux d'IFN- β et d'IL-6 de 10 à 100 fois plus importants, ainsi qu'une régulation à la hausse des molécules co-stimulatrices impliquées dans l'activation et la migration des DCs (CD40, CD86) et le récepteur des chimiokines (CCR7). La région poly-A/poly-U de l'ARNdb est reconnue par TLR-3 et RIG-I, mais pas par MDA-5.⁸⁵

Une autre stratégie également utilisée dans la vaccination anticancéreuse consiste à co-transfecter des ARNm codant pour des ligands ou récepteurs immunostimulants tels que le ligand OX40 (OX40L), le ligand 4-1BB (4-1BBL), le ligand du récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (GITRL), le ligand CD40 (CD40L). Les cytokines telles que GM-CSF, IL-12 et IL-15 codées par un ARNm constituent une autre catégorie de molécules utilisées pour améliorer la maturation des DC et la capacité d'amorçage des lymphocytes T.⁷⁵ Les ARNm codants pour des immunostimulants peuvent être injectés seuls ou avec d'autres agents immunothérapeutiques par voie intratumorale ou intranodale pour modifier le microenvironnement tumoral suppressif et produire une immunité antitumorale systémique efficace. Ces ARNm ne sont pas considérés comme des vaccins anticancéreux et peuvent faire l'objet d'une stratégie thérapeutique à part entière à base d'ARNm.⁷⁵

Cette stratégie est notamment mise en œuvre à travers le TriMix, une combinaison d'ARNm codant pour trois protéines activatrices du système immunitaire : CD70, CD40 ligand (CD40L) et TLR4 constitutivement actif. L'ARNm TriMix a augmenté l'immunogénicité de l'ARNm nu, non modifié et non purifié dans plusieurs études de vaccins contre le cancer et a été particulièrement associé à une augmentation de la maturation des DC et des réponses des lymphocytes T cytotoxiques (CTL).^{75,76,85}

Les adjuvants dans les vaccins à ARNm sont en plein essor, mais ils doivent être utilisés avec prudence car ils pourraient être contre-productifs, en particulier lors de l'utilisation de molécules immunostimulantes, en raison de leur interaction étroite avec la voie de l'immunité innée.⁷⁶

5- Limites des vaccins à ARNm IVT

Le vaccin à ARNm présente un profil de sécurité élevé, n'entraîne pas d'intégration du génome humain, n'a pas d'immunité antivectorielle et ne présente aucun risque de virus infectieux. Cependant, cette plateforme présente certains inconvénients⁸⁶ :

- Le stockage à très basse température est essentiel pour préserver la stabilité du vaccin.
- Le coût élevé du processus de production fait que ce type de vaccin n'est pas idéal pour les pays à faible revenu.
- Un manque d'approches systématiques pour l'identification des principaux mécanismes de dégradation physico-chimique du vaccin ARNm formulé final⁸⁷.

6- Applications cliniques

a- En infectiologie

Les vaccins contre les maladies infectieuses constituent actuellement l'application la plus avancée des ARNm thérapeutiques.

A la fin de 2019, 15 candidats vaccins à ARNm contre des maladies infectieuses étaient entrés dans des essais cliniques, aucun n'étant en phase III.⁷⁴ Ces vaccins développés étaient destinés à prévenir l'infection par différents agents pathogènes tels que le Virus Ebola, le virus responsable de la rage, le Cytomégalovirus CMV, le virus respiratoire syncytial RSV, le VIH, le virus Zika... Les essais cliniques portant sur les vaccins ARNm en infectiologie et répertoriés sur Clinicaltrials.gov sont listés en annexe 3.

À ce moment-là, pas moins de 5 à 6 ans n'étaient espérés avant qu'un vaccin à ARNm n'obtienne une autorisation réglementaire. Ces attentes ont été bouleversées lorsque la pandémie de COVID-19 s'est abattue sur le monde au début de 2020.⁷⁴

Le séquençage du génome du SARS-CoV-2 responsable de la pandémie mondiale actuelle en janvier 2020 a donné le coup d'envoi d'une course au développement de vaccins puissants contre le nouveau coronavirus. À l'époque, il aurait été optimiste d'espérer des résultats en quelques années. Par exemple, les vaccins contre le MERS-CoV et le SARS-CoV ont nécessité environ deux ans de développement avant d'entrer dans les essais de phase I et n'ont pas encore été approuvés.⁸⁸ De plus, le vaccin contre les oreillons, qui était alors le vaccin le plus rapidement développé, a nécessité 4 ans entre sa conception et son approbation. Les vaccins ARNm contre le SARS-CoV 2 de Moderna et Pfizer-BioNTech, en revanche, ont été approuvés 11 mois après leur lancement, dont 8 mois pour les essais cliniques. Leur mise au point rapide a été facilitée par trois facteurs : des décennies de recherches antérieures, d'importants investissements financiers et l'engagement des communautés scientifique et médicale.⁸⁹

Les vaccins contre le SARS-CoV-2 se sont appuyés sur de nombreuses années de recherche sur d'autres coronavirus, sur des systèmes d'administration de petits ARN interférents (siRNA) et sur des vaccins ARNm contre le cancer et contre d'autres maladies infectieuses. Par exemple, les recherches sur le MERS-CoV et le SARS-CoV ont suggéré que l'antigène devait être la protéine spike et que sa séquence d'acides aminés devait être légèrement modifiée pour verrouiller la protéine dans sa conformation de pré-fusion, maximisant ainsi son immunogénicité. Ces études ont permis à Moderna de générer la séquence de l'ARNm-1273 en 2 jours et de commencer les essais de phase I en 66 jours.⁷⁴

Les vaccins ARNm-1273 de Moderna et BNT162b2 de Pfizer-BioNTech sont synthétisés *in vitro* à partir d'une matrice d'ADN codant pour la protéine Spike intégrale à l'aide de l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les ARNm des deux vaccins ont une coiffe m⁷GpppNm et contiennent la N-méthyl pseudouridine à la place de l'uridine. La nature des régions 5' UTR et 3' UTR ainsi que la séquence polyA n'ont pas été divulgués par Moderna. En revanche nous savons que la séquence de la 5' UTR de BNT162b correspond à 51 nucléotides de l'alpha globine suivis d'une séquence codant un peptide signal. La séquence 3'UTR a été choisie à partir de l'amplificateur aminoterminal de l'ARNm scindé (AES) et de l'ARN ribosomal 12s

encodé pour les mitochondries. Concernant les véhicules de ces ARNm, les deux vaccins reposent sur des ARNm chargés dans des LNP cationiques. La formulation a été décrite comme suit pour l'ARNm-1273 : SM-102 (Un amino lipide ionisable), polyéthylène glycol-2000-dimyristoyl glycérol (PEG2000-DMG), cholestérol et 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DSPC) qui est un phospholipide zwitterionique. L'ARNm BNT162b lui, est encapsulé dans des LNP brevetés composés d'aminolipides ionisables, de phospholipides, de cholestérol et d'un lipide PEGylé. La technique de purification utilisée pour le vaccin à l'ARNm-1273 est celle de la colonne Oligo-dT tandis que BNT162b est purifié par précipitation au LiCl.⁹⁰ Les essais cliniques de phase III ont indiqué une efficacité supérieure à 95% pour les deux vaccins.⁹¹

Les seuls vaccins à ARNm à avoir évolué vers une application clinique à grande échelle et sur la population générale restent les deux vaccins développés contre le SARS-CoV2 qui ont obtenu entre autres, une autorisation temporaire d'utilisation de la part de la FDA et une autorisation de mise sur le marché (AMM) conditionnelle de la part de la Commission Européenne.^{88,89,92}

Ces vaccins ont montré, en bilan préliminaire, une efficacité qui a permis de contribuer à réduire drastiquement le nombre d'hospitalisations, de formes graves et de décès dans le monde.⁹³ Cependant, étant toujours à l'étude en phase III des essais cliniques, il est judicieux d'attendre la fin de la pandémie et/ou des essais cliniques afin d'apprécier le rôle réel qu'a joué le vaccin à ARNm dans cette crise sanitaire et recueillir plus de données sur les effets à court et long termes de ces vaccins.

Les différents essais cliniques en lien avec les vaccins ARNm en prévention du virus SARS-Cov2 sont listés en annexe 4.

b- En cancérologie

Les vaccins anticancéreux représentent des stratégies alternatives prometteuses pour traiter les tumeurs malignes. Les vaccins anticancéreux peuvent être conçus pour cibler les antigènes associés aux tumeurs qui sont exprimés de manière préférentielle dans les cellules cancéreuses, par exemple, les facteurs associés à la croissance, ou les antigènes qui sont uniques aux cellules malignes en raison d'une mutation somatique. Ces néo-antigènes, ou les

néo-épitopes qu'ils contiennent, ont été déployés comme cibles de vaccins à ARNm chez l'homme. La plupart des vaccins contre le cancer sont thérapeutiques, plutôt que prophylactiques, et cherchent à stimuler des réponses à médiation cellulaire, telles que celles des lymphocytes T cytotoxiques, capables d'éliminer ou de réduire la charge tumorale.⁷⁶ Les premières études de preuve de concept qui ont non seulement proposé l'idée de vaccins anticancéreux à ARN mais aussi fourni des preuves de la faisabilité de cette approche ont été publiées il y a plus de deux décennies (en 1995 et 1996)^{94,95}.

Depuis, de nombreuses études précliniques et cliniques ont démontré la viabilité des vaccins à ARNm dans la lutte contre le cancer. La plupart des essais cliniques portent sur des vaccins à ARNm transfectés *in vitro* dans les cellules dendritiques. Les essais cliniques en cours ou terminés concernent différents types de cancers notamment les mélanomes malins, le cancer de l'ovaire, le cancer de la prostate, le Glioblastome, Cancer du sein... Les essais impliquent des cancers à différents stades d'évolution et peuvent associer les vaccins à ARNm à d'autres traitements anti-cancéreux plus conventionnels. Les essais cliniques répertoriés sur [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) sont listés en annexe 5.

A titre d'exemple, Sahin et ses collègues ont développé dans le cadre d'un essai clinique (NCT02035956) des vaccins ARNm personnalisés à base de néo-épitopes pour 13 patients atteints de mélanome métastatique, un cancer connu pour sa fréquence élevée de mutations somatiques et donc de néo-épitopes. Ils ont immunisé contre dix néo-épitopes par individu en injectant de l'ARNm nu par voie intranodale. Des réponses des cellules T CD4+ ont été détectées contre la majorité des néo-épitopes, et une faible fréquence de maladie métastatique a été observée après plusieurs mois de suivi. Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont également été obtenus dans une étude de conception analogue qui a utilisé des peptides synthétiques comme immunogènes plutôt que de l'ARNm. Ensemble, ces essais récents suggèrent l'utilité potentielle de la méthodologie du vaccin personnalisé.⁷⁶

c- En allergologie

Bien que les études précliniques aient montré des résultats prometteurs en matière de vaccination anti-allergique, aucun essai clinique impliquant la vaccination ARNm en allergologie n'a été retrouvé sur le site [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

II- Immunothérapie passive à ARNm IVT

Le fait que l'ARNm puisse être conçu pour exprimer potentiellement n'importe quel gène d'intérêt a permis son utilisation pour une immunisation passive.

En présence de pathogènes ou de cellules tumorales, le système immunitaire développe en réponse à ces derniers, des outils de lutte qui vont permettre l'élimination du non-soi. Cela peut s'agir entre autres d'anticorps et de récepteurs spécifiques aux antigènes. Dans le cadre de l'immunothérapie passive, ces moyens de défense sont directement fournis aux cellules au travers des ARNm codants.

1- Thérapie adoptive par Lymphocytes T et NK

Une des approches d'immunothérapie dans le domaine du cancer est basée sur la réorientation des cellules T contre les cellules tumorales par l'intégration stable de récepteurs antigéniques spécifiques de la tumeur, soit avec des récepteurs de cellules T (TCR) qui reconnaissent les épitopes présentés par le CMH à partir d'antigènes intra- et extracellulaires, soit avec des CAR qui se lient aux antigènes de surface de la tumeur et sont indépendants du CMH. Les lymphocytes T sont ensuite amplifiés dans des systèmes de culture cellulaire. Les patients sont traités par un régime de chimiothérapie lymphodéplétante avant le transfert cellulaire adoptif (TCA) de ces produits cellulaires modifiés afin d'améliorer la prise de greffe.⁷⁵

Dans le domaine du TCA, les cellules CAR-T dirigées par CD19 sont les plus avancées. Les molécules CAR sont des immunorécepteurs artificiels, qui contiennent des fragments de liaison à l'antigène, généralement un fragment d'anticorps à chaîne unique à région variable, et des domaines de signalisation intracellulaire qui déclenchent l'activation des lymphocytes T lors de la liaison de l'antigène.⁹⁶ Plusieurs produits ont été autorisés pour le traitement de la leucémie et du lymphome à cellules B sur la base de taux de rémission de plus de 80%. Après cette réussite dans le domaine des hémopathies malignes, des tentatives d'étendre ce succès aux tumeurs solides comme le cancer du sein, de l'ovaire, le mélanome, le neuroblastome GBM ont été initiées mais avec des résultats moins impressionnants.⁸¹

Le plus souvent, les ADNc codant les CAR sont introduits dans les cellules T par des vecteurs lentiviraux. Cette expression permanente est considérée comme la clé du succès de la thérapie par cellules T CAR ; cependant, c'est aussi un point faible car il est plus difficile de l'arrêter en cas de toxicité ou de résistance au traitement. C'est pour cela que l'utilisation des ARNm qui eux, ont une durée de vie limitée, a été étudiée pour remplacer les vecteurs lentiviraux.

Pour la mise en œuvre d'une immunothérapie adoptive par Lymphocytes T à partir des ARNm, des cellules T sont prélevées au patient recevant la thérapie, isolées, mises en culture, transfectées par électroporation puis réinjectées au patient.⁹⁶ Les cellules CAR-T à ARNm doivent être administrées à plusieurs reprises, contrairement aux cellules CAR-T classiques qui expriment le CAR de manière constitutive. Par conséquent, les cellules CAR-T sont produites en grandes quantités et cryoconservées en lots qui peuvent être décongelés pour chaque cycle de traitement. Des protocoles conformes aux BPF pour la fabrication à grande échelle de cellules CAR-T à ARNm ont été établis, et il a été démontré que la congélation des cellules CAR-T à ARNm n'affectait pas négativement leur fonction.^{75,81}

Le principal risque des thérapies immunologiquement activatrices est constitué par les effets secondaires associés à la suractivation du système immunitaire, qui se traduisent principalement par le syndrome de libération de cytokines. Dans le cas de thérapies par CAR T, les toxicités sont étroitement associées à l'efficacité du traitement, puisqu'elles sont associées à l'expansion *in-vivo* des cellules T, qui peut être multipliée par 1000 pour obtenir une immunité efficace.⁸¹

Une autre stratégie envisagée plus tard utilise les cellules NK. En effet, l'utilisation de cellules CAR T allogéniques déjà préparées provenant d'autres donneurs comporte de graves risques de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), même en cas de compatibilité avec l'antigène leucocytaire humain (HLA) ce qui implique l'utilisation des cellules autologues.⁸¹ Les cellules NK CAR, en revanche, n'induisent pas de GVHD et sont de courte durée en raison de l'absence d'expansion clonale réduisant le risque d'effets secondaires potentiellement mortels. Les cellules NK allogéniques possèdent une activité d'élimination des tumeurs plus élevée que les cellules NK autologues en raison de l'incompatibilité des récepteurs de type immunoglobuline-like (KIR)-ligand entre le donneur et le receveur. Les cellules NK peuvent éliminer les tumeurs par trois mécanismes distincts⁸¹ :

- Par cytotoxicité spontanée en libérant de la perforine et de la granzyme
- Par la libération de cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ
- Par la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) qui dépend des cellules cancéreuses liées à des anticorps reconnus par le récepteur CD16 des cellules NK.

L'utilisation de cellules NK CAR allogéniques permettrait un traitement immédiat qui ferait gagner un temps précieux aux patients atteints de cancer.⁸¹

2- ARNm IVT codant pour des anticorps spécifiques

L'ARNm codant pour des anticorps élaborés contre des cellules cibles ou des antigènes viraux peut être exprimé *in vivo* par des cellules transfectées, principalement des cellules hépatiques, et atteindre la circulation pour devenir fonctionnels. De cette façon, les ARNm-LNP codant pour des anticorps modifiés contre différentes cibles virales et cellulaires, ainsi que des toxines, se sont révélés efficaces *in vivo*. Par exemple, Thran et ses collègues ont démontré un effet prophylactique et thérapeutique en utilisant des anticorps codés par ARNm, contre différents types de générateurs de maladies, y compris des virus, des toxines et des tumeurs. Ils ont utilisé différents formats d'anticorps codés, notamment une IgG entière avec des chaînes lourdes et légères codées par différents ARNm, et un agent neutralisant (VNA) basé sur le domaine VH d'un camélidé, tous deux encapsulés dans des LNP et administrés par voie intraveineuse.^{81,97}

Les AcM (Anticorps monoclonaux) standards établis sont des points de départ évidents pour explorer les ARNm codant pour des AcM avec des formulations ciblant le foie pour une production élevée de protéines dans les cellules résidant dans le foie et la libération de la protéine dans la circulation. Le rituximab, qui cible CD20, a été le premier AcM approuvé pour le traitement du cancer et est utilisé pour le traitement du lymphome non hodgkinien et de la leucémie lymphocytaire chronique. Le trastuzumab, qui cible HER-2/neu, est autorisé pour le traitement du cancer du sein surexprimant HER-2/neu et des adénocarcinomes métastatiques de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne. Chez des souris portant des xénogreffes de lymphome humain, l'ARNm codant pour le rituximab, administré par voie intraveineuse et formulé par LNP, a induit un effet antitumoral plus prononcé que la protéine recombinante

correspondante. Le trastuzumab codé sur un ARNm délivré par voie intraveineuse avec une formulation LNP ciblant le foie et récupéré dans le sérum de souris a exercé une cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC). Le traitement a prolongé la survie dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein HER-2/neu-positif.⁷⁵

Un autre exemple d'anticorps thérapeutiques codés par ARNm est celui des anticorps bispécifiques. Ces anticorps peuvent apporter de nouvelles propriétés pharmacologiques grâce à l'engagement conjoint de deux cibles, augmenter le profil de sécurité par rapport à une combinaison de deux anticorps grâce à une relocalisation ciblée vers la tumeur et réduire les coûts de développement et de fabrication associés à un seul médicament.⁹⁸ Les BiTEs (Engageurs de cellules T bispécifiques) entraînent la lyse des cellules tumorales en établissant un lien entre les antigènes associés aux tumeurs (AAT) et les cellules T. La plupart des anticorps bispécifiques présentent encore quelques inconvénients de manque d'efficacité, de faible stabilité et une tendance à l'agrégation lors d'un stockage à long terme. Une étude visant à déterminer si une plateforme d'ARNm pouvait être supérieure à la thérapie à base de protéines en ce qui concerne ces aspects, a démontré que la transfection d'ARNm chimiquement modifié et optimisé codant pour les BiTEs est supérieure à la thérapie protéique grâce à la présence durable des BiTEs *in vivo*. Le groupe a démontré que si les BiTEs à base d'ARNm pouvaient être observés *in vivo* pendant plusieurs jours, les niveaux plasmatiques des BiTEs à base de protéines étaient à peine détectables après 24 heures. En fin de compte, les deux approches ont permis d'éliminer les tumeurs ; toutefois, l'approche basée sur l'ARNm a nécessité de plus petites quantités et a démontré une présence beaucoup plus durable des BiTEs dans le sérum, ce qui est le principal avantage proposé de la version basée sur l'ARNm.⁸¹

L'ARNm utilisé pour l'administration d'Anticorps monoclonaux IgG et des anticorps bispécifiques, permet de relever les défis pharmacocinétiques (par exemple, demi-vie courte, clairance rapide) et de fabrication (par exemple, agrégats) pour accélérer le développement clinique.⁷⁵

3- Applications cliniques

Les études réalisées autour de l'immunothérapie passive ont abouti à des essais cliniques dans le domaine de la thérapie adoptive par Lymphocytes T CAR et des cellules NK

CAR. Une tentative d'essai clinique a débuté dans le cadre des AcM traduits à partir d'ARNm mais a été suspendue pour manque d'effectifs.

Des études cliniques de phase I ont exploré les cellules CAR-T à ARNm dirigées contre divers antigènes. Les études finalisées sont décrites en exemple :

Le traitement avec des cellules CAR-T à ARNm ciblant CD19 s'est avéré être bien toléré dans des études pilotes de phase I chez des patients pédiatriques (NCT02624258) et adultes (NCT02277522) atteints de lymphome hodgkinien classique. Deux cycles de traitement ont été menés, chacun représentant trois infusions de cellules CAR-T à 2 ou 3 jours d'intervalle avec une lymphodéplétion 1 ou 4 jours avant chaque cycle. Un patient sur les quatre patients évaluable a présenté une réponse complète. L'évaluation des transcriptions de l'ARNm CAR dans le sang de ce patient 2 jours après chaque transfert adoptif a confirmé la présence des cellules infusées. Chez les autres patients, aucune cellule CAR-T n'a été détectée dans la majorité des échantillons prélevés 2 jours après la perfusion.^{75,99}

Deux études de phase I (NCT01355965, NCT01897415) ont été lancées après avoir observé que l'injection répétée de cellules CAR-T à ARNm dirigés contre la mésothéline empêchait la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe de mésothéliome solide et disséminé. Les analyses préliminaires de huit patients sur 34 ont montré que cette approche est bien tolérée, à une exception près : Un patient a présenté un choc anaphylactique, probablement dû à l'induction d'anticorps IgE contre les séquences murines de la construction CAR. Un patient atteint d'un mésothéliome pleural malin avancé a présenté une réponse partielle après trois perfusions et un second patient atteint d'un cancer du pancréas métastatique a présenté une diminution de 40 % des cellules tumorales dans les ascites après avoir reçu huit perfusions intraveineuses suivies de deux injections intratumorales. Les transcrits CAR étaient détectables dans le sang des patients jusqu'à 3 jours après la perfusion. Les cellules CAR-T ont persisté plus longtemps dans les ascites et la tumeur primaire du patient atteint d'un cancer du pancréas, où les transcrits étaient détectables 6 jours après l'injection intraveineuse ou 13 jours après l'injection intratumorale, respectivement. Chez six autres personnes atteintes d'un cancer du pancréas, la maladie s'est stabilisée chez deux patients et un troisième a présenté une réponse métabolique partielle de la lésion cible.^{75,100}

Les essais cliniques portant sur les immunothérapies passives sont répertoriés sur Clinicaltrials.gov sont listés en annexe 6.

III- Les thérapies de remplacement des protéines par ARNm

1- Intérêt des thérapies de remplacement par ARNm

Pour les maladies causées par une haplo-insuffisance ou une perte de fonction, le remplacement de la protéine défectueuse est une stratégie de traitement simple. Les protéines synthétisées par des bactéries ou des cellules en culture, ou les peptides synthétiques sont couramment utilisés pour fournir ou remplacer les protéines défectueuses. Bien que l'utilisation de protéines recombinantes ait élargi l'arsenal de traitement de certaines maladies, elle présente de nombreux inconvénients, notamment un coût élevé, une immunogénicité potentielle, et ne convient qu'à certaines entités pathologiques. Les thérapies à base d'ARNm offrent une alternative efficace.¹⁰¹ Une seule molécule d'ARNm peut être traduite en une grande quantité de molécules protéiques en quelques heures ou jours de traitement. En outre, la protéine traduite passera par toutes les procédures de modification post-traductionnelle requises, notamment la phosphorylation, l'acétylation et la glycosylation, ce qui garantit un produit protéique entièrement fonctionnel.¹⁰²

La suppléance de protéines qui ne sont pas exprimées ou qui ne sont pas fonctionnelles, ainsi que la substitution de protéines étrangères qui activent ou inhibent des voies cellulaires (par exemple, des anticorps thérapeutiques vus précédemment), sont les applications les plus évidentes des thérapies à base d'ARNm IVT. Plusieurs maladies sont à l'étude, dans lesquelles les protéines défectueuses sont remplacées par la production *in vivo* de protéines thérapeutiques intracellulaires et sécrétées à partir d'ARNm IVT transfectés.¹

La première application préclinique d'un ARNm IVT pour le remplacement d'une protéine déficiente et physiologiquement pertinente a été rapportée en 1992 et a demeuré le seul travail de ce type pendant près de deux décennies.¹ La découverte que les nucléosides modifiés peuvent réduire l'activité immunostimulante de l'ARN a été déterminante pour faire progresser ce domaine d'application. Les expériences précliniques ont montré que l'utilisation d'ARNm IVT modifié par des nucléosides, associée à des protocoles améliorés de purification

de l'ARNm, élimine l'activation immunitaire par l'ARNm et augmente sa traduction, ouvrant ainsi l'application thérapeutique de l'ARNm IVT pour le domaine du remplacement des protéines.⁵⁹

L'ARNm IVT contenant des nucléosides modifiés et codant pour la protéine B du surfactant (SPB) a été testé dans un modèle murin de maladie pulmonaire congénitale létale causée par l'absence de la protéine SPB. L'administration par aérosol de l'ARNm SPB dans le poumon deux fois par semaine a protégé les souris de l'insuffisance respiratoire et a prolongé leur durée de vie moyenne. Dans des expériences menées sur des souris et des macaques, l'ARNm IVT modifié par la pseudouridine, purifié par chromatographie liquide à haute performance et codant pour l'érythropoïétine, a été administré, et des niveaux d'érythropoïétine thérapeutiquement pertinents ont été détectés. Dans un modèle de maladie asthmatique, l'administration intratrachéale d'un ARNm modifié par des nucléosides codant pour le facteur de transcription des cellules T régulatrices, la protéine P3 (FOXP3), a rééquilibré les réponses des cellules TH pulmonaires et protégé les souris contre l'inflammation tissulaire et l'hyperréactivité des voies respiratoires induites par les allergènes. Il a également été démontré que l'injection intramyocardique directe d'ARNm IVT contenant de la pseudouridine et de la 5-méthylcytidine, et codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA), améliorait la fonction cardiaque et augmentait la survie à long terme dans un modèle murin d'infarctus du myocarde.¹ Toutes ces études ont encouragé la progression vers des études cliniques.

2- Limites des thérapies de remplacement par ARNm

Malgré les résultats prometteurs de nombreuses études, le développement de médicaments à base d'ARNm IVT à des fins de remplacement de protéines est toujours associé à des défis techniques. Pour l'administration de protéines à base d'ARNm IVT, il faut tenir compte des différences de modification post-traductionnelle propres à chaque type de cellule. Par exemple, pour les glycoprotéines, la composition du glycoconjugué n'est pas codée dans l'ARNm et dépend du type de tissu dans lequel la protéine est générée. Toutes les cellules n'ont pas la capacité de glycosyler correctement chaque protéine, en particulier si une glycosylation très complexe est nécessaire. Un autre type de modification post-

traductionnelle est le traitement protéolytique. Le traitement par les endoprotéases fait partie intégrante de la maturation de divers polypeptides fonctionnels, notamment les facteurs de croissance, les cytokines, les récepteurs, les neuropeptides, les enzymes, les hormones et les protéines plasmatiques.^{1,103} D'autres protéines nécessitent un clivage bien défini par des protéines convertases vers leur forme biologiquement active, ce qui se produit au niveau intracellulaire dans l'appareil de Golgi et les granules sécrétoires. Plusieurs sous-types de convertases ont été identifiés avec des spécificités et une distribution tissulaire différentes. Les cellules qui sont transfectées avec l'ARNm IVT doivent posséder la convertase ou l'endoprotéase requise pour transformer les précurseurs codés en produits fonctionnels.^{1,104}

Lorsque les protéines sécrétées sont exprimées dans des tissus hétérologues, leurs peptides de signal de sécrétion peuvent être mal reconnus et la plupart des protéines peuvent rester dans les cellules. Les forces relatives du signal de sécrétion diffèrent ; ainsi, l'échange des peptides de signal naturels pourrait conduire à une augmentation de la sécrétion des protéines. Par exemple, dans un modèle animal d'expression plasmidique de l'érythropoïétine dans les muscles, une quantité significativement plus importante d'érythropoïétine était sécrétée lorsque le peptide signal naturel de l'érythropoïétine était remplacé par celui de l'activateur du plasminogène tissulaire.^{1,105} Pour obtenir un effet maximal, l'ARNm IVT devrait idéalement être transfecté dans des cellules qui sécrètent naturellement la protéine codée, sinon une optimisation du peptide signal pourrait être nécessaire.^{1,106}

3- Applications cliniques

Il est très intéressant d'utiliser l'ARNm IVT pour une large gamme d'applications de remplacement des protéines, y compris celles qui sont actuellement traitées avec des protéines recombinantes ainsi que celles pour lesquelles la technologie des protéines recombinantes ne peut être utilisée.

Les obstacles au développement peuvent être moins importants pour les protéines ayant une large fenêtre thérapeutique, une activité à faibles doses et pour lesquelles il existe déjà une compréhension pharmacocinétique et pharmacodynamique établie chez l'homme. Il peut également être plus facile de développer des approches de remplacement de protéines

basées sur l'ARNm IVT pour les protéines qui sont exprimées dans des organes facilement accessibles tels que le foie, ainsi que pour les protéines qui sont totalement inactives dans la population de patients concernée et dont la contrepartie substituée peut donc être instantanément et facilement quantifiée pour un meilleur contrôle de sa biodisponibilité.¹

De nombreuses études sur des modèles animaux ont été menées et ont montré des résultats positifs quant à l'expression des protéines d'intérêt.

Le premier essai clinique (NCT03370887) a été mené pour la première fois chez l'homme dans le but d'évaluer la sécurité et les effets thérapeutiques potentiels de cette modalité. Des hommes atteints de diabète de type 2 (DT2) ont reçu des injections intradermiques d'ARNm modifié codant pour le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A) ou d'une solution saline tampon placebo (des obligations éthiques ont empêché l'utilisation d'un ARNm témoin non traduisible) à des sites randomisés sur l'avant-bras. Les seuls effets indésirables liés au traitement ont été de légères réactions au site d'injection. La microdialyse cutanée a révélé des niveaux élevés de protéine VEGF-A sur les sites traités par ARNm par rapport aux sites traités par placebo, environ 4 à 24 heures après l'administration. Des améliorations du flux sanguin cutané basal 4 heures et 7 jours après l'administration ont été détectées par fluximétrie et imagerie laser Doppler. L'ARNm du VEGF-A intradermique a été bien toléré et a entraîné une expression fonctionnelle locale de la protéine VEGF-A et une amélioration transitoire du flux sanguin cutané chez les hommes atteints de DT2. L'ARNm VEGF-A pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour l'angiogenèse régénérative.¹⁰⁷

D'autres essais cliniques ont suivi s'intéressant à des maladies métaboliques par exemple l'acidémie méthylmalonique (NCT04899310) qui est due à une déficience de l'enzyme mitochondriale méthylmalonic-CoA mutase (MUT), la thérapie consiste en la transfection d'ARNm IVT codant pour la MUT.¹⁰⁸ Une autre thérapie (NCT04159103) pour le traitement de l'acidémie/acidurie propionique (AP) causée par une déficience de l'enzyme mitochondriale, la propionyl-CoA carboxylase (PCC) utilise l'ARNm IVT codant à la fois pour la PCCA humaine (hPCCA) et la PCCB (hPCCB).¹⁰⁹

Les essais cliniques répertoriés sur Clinicaltrials.gov sont listés dans l'annexe 7.

IV- Edition du génome

1- Principe de l'édition du génome

L'édition du génome permet d'apporter des modifications très spécifiques à la séquence d'ADN d'une cellule (édition du génome somatique) ou d'un organisme vivant (Edition du génome constitutionnelle). L'édition de gènes est réalisée par des enzymes (nucléases) qui vont couper l'ADN de façon ciblée. Ce ciblage peut se faire de différentes façons. Lorsque l'ADN est coupé, la cellule va tenter de le réparer. En absence d'ADN « moule », la réparation sera incomplète et l'ADN sera rendu non codant. En présence d'ADN moule la réparation de l'ADN induira soit la correction d'une anomalie génétique préexistante soit l'insertion d'un ADN de remplacement.

2- Les nucléases éditrices de génome

Il existe quatre groupes de nucléases d'édition du génome. Elles sont classées en fonction de leurs structures : les méganucléases (MN), les nucléases à doigts de zinc (ZFN), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) et les nucléases associées à CRISPR.

MNs : Les MNs sont des endonucléases caractérisées par leur grand site de reconnaissance (14-40 pb). Les grands sites de reconnaissance et la faible cytotoxicité pour les cellules de mammifères font des MN des outils attrayants pour l'édition du génome du fait de leur très grande spécificité. Plus de 100 MNs avec différentes spécificités de site ont été identifiés. Cependant, le nombre de MNs naturels est encore limité, et il est insuffisant pour traiter tous les loci potentiellement intéressants.²⁹

ZFNs : (Zinc Finger Nuclease) utilisées pour l'édition du génome sont des protéines chimères composées de domaines à doigts de Zinc fusionnés avec une nucléase. Elles sont obtenues par génie génétique (expression d'un ADN de fusion codant les différentes sous parties). Les domaines à doigts de Zinc sont des sites de liaison à l'ADN qui reconnaissent et se lient à des séquences spécifiques de trois ou quatre paires de bases. Pour conférer une spécificité à une séquence cible de neuf paires de bases, il faut donc trois domaines de liaison

à l'ADN. Ces trois domaines sont fusionnés à une sous-unité de la nucléase bactérienne Fok1. Pour faciliter la coupure d'un double brin sur un site spécifique, il faut concevoir deux protéines de fusion ZFN, l'une se liant de chaque côté du site cible, sur des brins d'ADN opposés. Lorsque les deux ZFN sont liées, les sous-unités Fok1, étant à proximité, se lient entre elles pour former un dimère actif qui coupe l'ADN cible sur les deux brins.¹¹⁰

TALENs : (Transcription Activator-like Effector Nuclease) Les protéines de fusion TALENs sont conçues pour se lier à des séquences d'ADN spécifiques qui encadrent un site cible. Mais au lieu d'utiliser des domaines à doigt de zinc, les TALENs utilisent des domaines de liaison à l'ADN dérivés de protéines provenant d'un groupe d'agents pathogènes des plantes. Pour des raisons techniques, les TALENs sont plus faciles à concevoir que les ZFN, en particulier pour les sites de reconnaissance plus longs. Les TALENs contiennent plusieurs domaines répétés de 33 à 35 acides aminés qui reconnaissent chacun une seule paire de bases. Comme pour les ZFN, les TALENs utilisées en édition du génome sont des protéines de fusion comprenant un domaine Fok1. Les protéines chimères sont conçues de telle sorte qu'une fois le site cible lié des deux côtés, la nucléase Fok1 dimérisée peut introduire une rupture double brin à l'emplacement souhaité de l'ADN.^{29,110}

CRISPR-Cas9 : (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) Contrairement aux ZFNs et aux TALENs, CRISPR-Cas9 utilise la liaison ARN-ADN, plutôt que la liaison protéine-ADN, pour guider l'activité de la nucléase, ce qui simplifie la conception et permet l'application à un large éventail de séquences cibles. CRISPR-Cas9 est dérivé du système immunitaire adaptatif des bactéries.¹¹⁰ Le système CRISPR-Cas9 se compose de deux molécules clés : Une enzyme appelée Cas9 qui agit comme une paire de "ciseaux moléculaires" qui peut couper les deux brins d'ADN à un endroit spécifique du génome. L'autre molécule est un morceau d'ARN appelé ARN guide (ARNg). Il s'agit d'un petit morceau de séquence d'ARN préconçue (d'environ 20 bases) situé dans une séquence d'ARN plus longue. Cette séquence se lie à l'ADN et la séquence préconçue guide Cas9 vers la bonne partie du génome. Cela permet de s'assurer que l'enzyme Cas9 coupe au bon endroit du génome.¹¹¹

3- Méthodes de mise à disposition des nucléases dans les cellules

La livraison de nucléases aux bons tissus et cellules et au bon moment est la clé de la réussite de l'application de la technologie d'édition du génome en médecine. Étant donné que les nucléases peuvent potentiellement être mutagènes et immunogènes, le système de livraison idéal permettrait une activité nucléasique transitoire. Actuellement, les nucléases d'édition du génome peuvent être délivrées sous forme d'ADN, d'ARNm et de protéines, chacun présentant des avantages et des inconvénients (tableau 1).²⁹

	<u>ADN</u>	<u>ARNm</u>	<u>Protéines</u>
Transcription nucléaire	Oui	Non	Non
Traduction dans le cytoplasme	Oui	Oui	Non
Début de l'édition du génome après transfection (h)	>8	4-6	3
Stabilité	Excellente	Bonne (sur ARNm modifié)	Mauvaise
Durée	1 semaine	Quelques jours	24 - 48h
Risque d'intégration	Oui	Non	Non
Risque de hors-cible (<i>Off-target</i>)	Elevé	Faible	Faible

Tableau 1: Caractéristiques des différentes méthodes de livraison des nucléases.²⁹

4- Avantages de la mise à disposition des nucléases par ARNm IVT

Les différentes technologies d'édition du génome requièrent pour une édition génomique optimale : i) la présence de la nucléase pour une courte durée, ii) des effets hors-cible minimes et iii) une bonne stabilité *in vivo* avec une faible immunogénicité.^{29,50}

L'ARNm IVT contourne le risque d'insertion dans le génome et la nécessité d'une entrée nucléaire pour la transcription, ce qui permet une édition efficace du génome. L'expression courte mais robuste de l'ARNm se traduit par une activité élevée et des effets hors cible potentiellement limités. Dans le cas de l'édition du génome, les demi-vies de l'ARNm de la nucléase et de ses produits protéiques sont des facteurs déterminants pour l'efficacité de l'édition. Pour cela, l'ARNm IVT subit des modifications sur sa structure afin d'optimiser son

activité. De plus, la cinétique de l'expression protéique a également contribué à l'efficacité d'édition de l'ARNm codant pour des nucléases. Lorsqu'il est délivré, l'expression protéique de l'ARNm commence de manière presque transitoire, atteint un pic en quelques heures (~6-24 h) et persiste pendant quelques jours. La durée d'expression est suffisamment longue pour l'édition du génome.²⁹ L'utilisation d'ARNm, soit par injection directe *in vivo*, soit par traitement *ex vivo*, permettrait d'affiner le dosage, ce qui n'est pas possible avec l'administration de plasmides ou de virus. Les avantages supplémentaires d'une grande efficacité de transfection sans toxicité cellulaire seraient bénéfiques pour la génération d'animaux transgéniques et le traitement de maladies génétiques humaines, avec une application potentielle à d'autres maladies y compris le cancer.^{1,50}

5- Applications cliniques

Les ARNm codant pour Cas9, les TALENs et les ZFNs ont été utilisés avec succès pour modifier des génomes *ex vivo* dans des cellules embryonnaires de différentes espèces et *in vivo* chez des rongeurs et des poissons zèbres.⁵⁰

Plusieurs essais cliniques utilisant des ARNm codant pour des nucléases programmables sont en cours. Pour le traitement du VIH, la délétion de CCR5, le principal corécepteur nécessaire à l'infection par le VIH-1, rend les cellules résistantes à l'infection par le VIH-1. La transplantation avec des cellules souches hématopoïétiques de donneurs portant une délétion homozygote naturelle de CCR5 a montré un potentiel de guérison. Ainsi, l'édition thérapeutique du génome sur le locus génomique CCR5 a été développée comme une alternative au traitement antiviral à vie des infections par le VIH-1. Sangamo Therapeutics a mis au point un projet visant à utiliser le SB-728mR, l'ARNm de ZFNs spécialisés ciblant le gène CCR5 dans les cellules humaines, pour le traitement du VIH (NCT02500849). Pour perturber l'expression du gène CCR5, le SB-728mR a été transfecté dans les cellules souches hématopoïétiques par électroporation. Un autre essai (NCT03617198) consiste à utiliser le SB-728mR pour modifier les cellules T, et l'essai de phase I a montré que le traitement était sûr.

29,112

Les essais cliniques portant sur l'ARNm IVT dans l'édition du génome et répertoriés sur Clinicaltrials.gov sont listés en annexe 8.

V- Reprogrammation des cellules IPS

1- Les types de cellules souches

Les cellules souches sont à la base de tous les organes et tissus du corps humain. Elles ont le potentiel de s'auto-renouveler, de se différencier et de servir de précurseurs aux cellules somatiques. Lorsqu'une cellule souche se divise en différentes cellules, chaque cellule nouvellement développée a le potentiel d'être une cellule souche ou de devenir tout autre type de cellule capable de remplir sa fonction spécialisée. Il peut s'agir d'une cellule musculaire, d'un globule rouge ou d'une cellule du cerveau par exemple.¹¹³

Cela n'a pas seulement des implications au début de la vie, mais aussi après une blessure, où les cellules souches agissent comme un mécanisme de réparation interne en reconstituant les cellules blessées ou mortes.¹¹⁴ Les cellules souches présentent deux caractéristiques principales qui les rendent uniques :

- Nature non spécialisée :

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées qui ont la capacité de se renouveler par division cellulaire. Elles n'ont pas de structures ou fonctions spécifiques.¹¹³ Par exemple, une cellule souche non spécialisée ne peut pas transporter l'oxygène comme un globule rouge ou pomper le sang comme une cellule cardiaque. Cependant, lorsqu'elle reçoit les signaux appropriés, elle peut se transformer en différents types de cellules spécialisées, comme les cellules musculaires, les cellules sanguines, etc.¹¹⁴

- Potentiel de différenciation :

Le processus de différenciation permet aux cellules souches non spécialisées d'acquérir des fonctions et des propriétés spécifiques. Les signaux qui déclenchent cette transition peuvent être intrinsèques (de l'intérieur de la cellule) ou extrinsèques (de l'extérieur de la cellule). Les signaux extrinsèques qui peuvent déclencher cette transition peuvent prendre la forme de signaux mécaniques ou chimiques provenant des cellules voisines.^{113,114}

Le potentiel de différenciation des cellules souches est variable selon les organes. Certains organes, dont l'intestin et la moelle osseuse, subissent régulièrement des divisions pour réparer et reconstituer les cellules endommagées. En revanche, dans des organes tels que le pancréas et le cœur, la fréquence de division et de différenciation des cellules souches est beaucoup plus faible.^{113,114}

La capacité d'une cellule à se différencier en un autre type de cellule spécialisée définit la potence des cellules souches. Sur la base de leur potence, de leur degré de plasticité ou de leur polyvalence en matière de développement, les cellules souches peuvent être classées comme suit :

a- Les cellules totipotentes

Il s'agit de la capacité des cellules à donner naissance à tous les types de cellules du corps, y compris les cellules extra-embryonnaires ou placentaires. Il s'agit des cellules souches les plus polyvalentes, capables de développer un tout nouvel organisme.¹¹³ Ces cellules sont produites par la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde. Les seules cellules totipotentes sont l'ovule fécondé et les cellules produites par les premières divisions de l'ovule fécondé.¹¹⁵

b- Les cellules pluripotentes

Il s'agit de la capacité des cellules à produire tout type de cellules, à l'exception des cellules des annexes. Après quatre jours de fécondation, les cellules souches totipotentes donnent naissance à des cellules souches pluripotentes. Ces cellules pluripotentes sont caractérisées par un auto-renouvellement et un potentiel de différenciation pour tous les types de cellules de l'organisme adulte.^{113,115}

c- Les cellules multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont appelées des progéniteurs. Elles peuvent se différencier en un certain nombre de cellules, mais uniquement celles d'une famille de cellules étroitement apparentées. Par exemple, la moelle osseuse contient des cellules souches multipotentes qui donnent naissance à toutes les cellules du sang mais pas à d'autres types de cellules.¹¹⁵

d- Les cellules oligopotentes

Les cellules souches oligopotentes peuvent se différencier en quelques cellules seulement, comme les cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes.^{113,115}

e- Les cellules unipotentes

Les cellules unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type de cellules, le leur, mais ont la propriété de s'auto-renouveler, ce qui les distingue des cellules non-souches. Parmi ces cellules unipotentes figurent les cellules progénitrices musculaires. La plupart des tissus épithéliaux s'auto-renouvellent tout au long de la vie adulte en raison de la présence de cellules progénitrices unipotentes.¹¹⁵

2- Les sources de cellules souches

En fonction de leur origine, les cellules souches peuvent être divisées en cellules précoces (ou embryonnaires) et en cellules matures (ou adultes).

a- Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires se trouvent dans la masse cellulaire interne du blastocyste après cinq jours de développement. Ces cellules sont potentiellement immortelles et sont dérivées des embryons avant qu'ils ne s'implantent dans l'utérus. Ces cellules sont généralement âgées de 4 à 5 jours et sont appelées blastocystes.¹¹⁴

Ces cellules sont pluripotentes et peuvent se renouveler à l'infini. Elles ont la capacité de se diviser pendant de longues périodes et de conserver leur capacité à fabriquer tous les types de cellules de l'organisme.¹¹³

b- Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes, également connues sous le nom de cellules souches somatiques ou progéniteurs, sont des cellules indifférenciées qui sont multipotentes. Ces cellules se trouvent à divers endroits de l'organisme et contribuent à maintenir un nombre de cellules saines et à remplacer les cellules mourantes ou endommagées.^{113,114}

Ces cellules sont retrouvées dans le tissu du cordon ombilical humain, la moelle osseuse, le sang de cordon ou encore le tissu adipeux.¹¹⁶

c- Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites « iPS » sont des cellules souches équivalentes aux cellules souches embryonnaires mais obtenues à partir de cellules différenciées adultes reprogrammées génétiquement pour perdre leurs spécificités acquises et revenir à l'état pluripotent.^{115,117} Ces cellules suscitent un grand engouement de la communauté scientifique et médicale. En effet leur capacité à pouvoir se différencier en n'importe quelle cellule du corps humain laisse supposer que l'on pourrait les utiliser pour de la thérapie cellulaire ou pour générer des modèles cellulaires d'étude de pathologies humaines (organoïdes et ingénierie cellulaire).

Dans cette partie, ces cellules iPS seront revues plus en détail afin d'illustrer l'intérêt des ARNm IVT dans l'obtention de ces derniers.

3- Les cellules IPS

a- Obtention des cellules IPS

Les cellules souches pluripotentes induites sont dérivées de cellules somatiques adultes par l'expression ectopique de quatre facteurs de transcription spécifiques de cellules souches qui sont OCT4, SOX2, MYC et KLF4 (facteurs de Yamanaka). Ces facteurs sont exprimés dans la cellule suite à la modification génique des cellules adultes utilisant des vecteurs viraux.¹¹⁸

De nombreuses approches ont été évaluées afin de remplacer l'utilisation de vecteurs viraux afin de véhiculer les ADNc codant les facteurs de yamanaka et générer des cellules iPS. En effet, bien que les approches virales soient robustes et efficaces, elles comportent un risque énorme de mutagenèse par insertion et de transformation tumorale, ce qui contraint leurs applications cliniques. Pour surmonter ce problème de sécurité, des progrès significatifs ont été réalisés dans l'établissement d'approches virales non intégratives (adénovirus, virus sendai) et d'approches non virales (transfection de plasmides, Piggybac transposon, vecteur mini circulaire, épisode, ARNm modifié, micro-ARN, protéines recombinantes) pour dériver

les cellules iPS. Ces approches diminuent ou éliminent la possibilité de toute altération génomique. Cependant, elles demandent beaucoup de travail et/ou sont considérées comme moins efficaces, avec une cinétique lente et un grand nombre de colonies partiellement reprogrammées. Une caractérisation approfondie des clones/cellules iPS générés par ces approches non intégratives est essentielle pour éviter les effets indésirables avant les applications de thérapie cellulaire.^{117,119}

b- Intérêt des cellules IPS

- Les cellules IPS en médecine régénérative

Le potentiel des cellules IPS à générer des tissus fonctionnels a une importance de taille dans le traitement des maladies dégénératives, où la principale option de traitement est le remplacement des tissus endommagés par des tissus de donneurs sains. Alors que l'approvisionnement limité en tissus de donneurs et les complications immunitaires associées limitent cette option de traitement, les tissus dérivés des cellules IPS promettent de surmonter ces restrictions en générant des tissus fonctionnels à partir d'une source de cellules isogéniques ou de HLA appariées. La faisabilité du remplacement d'un tissu endommagé par un tissu ou un organe dérivé des iPSC a été démontré dans de nombreuses études, dont certaines ont progressé avec succès vers des essais cliniques. Le premier essai clinique a été lancé en 2014, à l'aide de cellules épithéliales pigmentées de la rétine (EPR) dérivées de cellules iPS humaines pour traiter la dégénérescence maculaire.¹²⁰

- Modélisation de pathologies humaines

Parallèlement à la médecine régénérative, les iPSCs apparaissent comme une plateforme attrayante pour la modélisation des maladies et les applications de découverte de médicaments. Traditionnellement, les maladies humaines sont étudiées dans des modèles animaux bien établis, qui offrent un cadre *in vivo* pour étudier les mécanismes pathologiques. Ces modèles animaux ont également joué un rôle essentiel dans la découverte de stratégies thérapeutiques pour de nombreuses maladies. Cependant, les différences inter-espèces substantielles entre les modèles humains et les modèles de rongeurs couramment utilisés limitent souvent la compréhension adéquate de la physiopathologie des maladies humaines. Ainsi, les stratégies thérapeutiques développées sur des modèles animaux ont souvent

échoué en clinique, d'où la nécessité de développer des modèles de maladies spécifiques à l'homme pour compléter les modèles animaux actuels.¹²⁰

Les cellules iPS humaines sont particulièrement utiles pour modéliser des maladies humaines dont les causes génétiques sont définies. La modélisation des maladies à l'aide des iPS implique la dérivation des iPS avec la mutation responsable de la maladie, suivie de la différenciation des iPS en cellules pertinentes pour la maladie. Ces iPS pourraient potentiellement être dérivées directement des patients, afin de fournir des cellules pertinentes pour la maladie, tout en ouvrant la voie à la modélisation personnalisée de la maladie, le thème central de la médecine de précision.^{117,120}

4- Utilisation des ARNm IVT dans la reprogrammation des cellules iPS

La transfection d'ARN messenger codant pour des facteurs de reprogrammation est une stratégie souhaitable et simple pour dériver des iPS de qualité clinique sans compromettre l'intégrité génomique.¹²¹

En 2010, il a été démontré que l'ARNm IVT contenant de la pseudouridine et de la 5-méthylcytidine et codant pour les facteurs de Yamanaka pouvait être une stratégie sûre pour reprogrammer efficacement des cellules vers la pluripotence sans laisser de traces résiduelles de transgènes. L'ARNm IVT n'a pas seulement été utilisé pour induire la pluripotence, mais aussi pour différencier les cellules souches pluripotentes induites. L'introduction de l'ARNm IVT codant pour la protéine de différenciation du myoblaste dans les iPS a permis d'obtenir des résultats positifs et a entraîné leur différenciation directe en cellules de type myocyte.^{50,121}

La reprogrammation et la différenciation directe des cellules à l'aide de l'ARNm IVT bénéficient de son efficacité de transfection *in vitro*, de son expression transitoire sans intégration génomique et de sa capacité à transférer des mélanges complexes. L'absence d'expression résiduelle des transgènes dans les iPS induites par l'ARNm IVT facilite non seulement leur utilisation pour la modélisation des maladies et les tests toxicologiques, mais constitue également la base de leur application en médecine régénérative.^{1,50}

Cependant, la nécessité de disposer de cellules nourricières et de milieux de culture cellulaire contenant des composants d'origine animale constitue une limitation majeure, car

elle comporte un risque supplémentaire de transmission d'agents pathogènes. Pour éviter cela, plusieurs groupes ont dérivé des iPS dans des conditions sans cellules nourricières et/ou sans xéno-composants avec une grande efficacité de reprogrammation en utilisant la reprogrammation basée sur l'ARNm. Dans l'ensemble, la stratégie de reprogrammation basée sur les ARNm est très prometteuse pour potentialiser l'efficacité clinique et le profil de sécurité des iPS dérivées et des types de cellules obtenues après leur différenciation.¹²¹

Warren et al. ont publié la première démonstration rigoureuse de l'induction d'iPS par transfection d'ARNm à la fin de 2010. Cette recherche s'est heurtée au problème de l'immunogénicité de l'ARNm exogène ce qui a conduit à l'utilisation des ARNm modifiés selon Kariko et Weissman.¹¹⁹

Dans le cadre d'essais de reprogrammation de fibroblastes humains, une réduction frappante de l'immunogénicité de l'ARNm a été observée lorsque les nucléosides non standard pseudouridine et 5-méthylcytidine ont remplacé l'uridine et la cytidine dans les transcrits synthétiques.^{122,123}

Le protocole de reprogrammation " ARNm modifié " alors publié, intègre plusieurs optimisations éclairées par des recherches antérieures sur les iPS, notamment un cocktail d'ARNm pondéré stœchiométriquement en faveur du facteur de reprogrammation le plus puissant, Oct4, et l'utilisation d'une culture à 5 % d'oxygène. Appliqué à plusieurs lignées de fibroblastes de faible passage, ce protocole a donné des résultats impressionnants, avec des colonies iPS à part entière apparaissant en moins de 20 jours, contre les ~30 jours plus typiques des protocoles viraux traditionnels, et avec une productivité des colonies dans certains cas jusqu'à deux ordres de grandeur supérieurs à ceux obtenus couramment avec des vecteurs viraux intégratifs.¹²²

Malgré la disponibilité de réactifs commerciaux tels que l'ARNm synthétique préfabriqué qui a grandement simplifié l'adoption du système de reprogrammation par ARNm, son adoption par la communauté des chercheurs a été limitée par rapport aux systèmes épisomal et Sendai. Cela peut être attribué principalement à la nature exigeante des premiers protocoles, qui nécessitaient environ deux semaines de transfections quotidiennes consécutives. Pour l'utilisateur d'iPS orienté vers la recherche, le temps de manipulation plus

long et la discipline nécessaire pour suivre des protocoles de transfection 7 jours sur 7 l'emportent souvent sur l'avantage d'obtenir plus de colonies d'iPS en moins de temps.

Enfin, alors que le sang gagne en popularité en tant que point de départ alternatif aux fibroblastes pour les dérivations d'iPS, les progrès limités réalisés jusqu'à présent dans l'adaptation du système ARNm à la reprogrammation des types de cellules dérivées du sang sont apparus comme une limitation importante du système.¹²²

5- Applications précliniques et cliniques

En 2006, la cellule souche pluripotente induite (iPS) a été présentée au monde entier, ouvrant la voie au développement d'une multitude de nouvelles alternatives thérapeutiques pour traiter un large éventail de maladies. Cependant, malgré l'immense potentiel de la thérapie cellulaire, relativement peu d'essais cliniques évaluant la technologie iPS se sont traduits par des protocoles de traitements interventionnels et cliniquement appliqués.¹²³

Une revue des essais cliniques en cours ou terminés sur les IPS publiée en septembre 2021 a montré que sur 81 essais cliniques, 62 essais sont à but non thérapeutique tandis que seulement 19 sont à but thérapeutique.¹²⁴

Au vu des informations publiées sur ClinicalTrials.gov concernant les essais cliniques, il n'est pas possible d'identifier la technique utilisée pour la reprogrammation des cellules iPS et si parmi ces essais, certains utilisent l'ARNm IVT.

Au niveau mondial, les maladies qui ont été ciblées pour un traitement lié aux iPS, ou sur lesquelles des essais cliniques basés sur les iPS ont été réalisés, sont les suivantes^{117,124} :

- Cardiomyopathie ischémique
- Insuffisance cardiaque
- Maladie de Parkinson
- Cellules immunitaires
- Réaction du greffon contre l'hôte GVHD
- Lésion de la moelle épinière
- Dégénérescence maculaire liée à l'âge

Les cellules souches et leurs dérivés se heurtent encore à des obstacles difficiles à franchir pour leur approbation clinique. Dans le cas des iPS, des complications potentielles sont attribuées à leurs propriétés pluripotentes qui pourraient conduire à la formation de tumeurs.¹²⁵

En outre, les résultats très prometteurs des études précliniques ont été difficilement reproduits chez les patients. Il peut s'avérer extrêmement difficile de satisfaire à toutes les exigences des BPF (bonnes pratiques de fabrication), d'effectuer des contrôles stricts au cours du processus de production et d'adapter le produit à un usage clinique. En dépit de ces défis décourageants, les innovations technologiques et la recherche présentent constamment de nouvelles solutions pour assurer une fabrication hautement standardisée, garantissant la sécurité et l'efficacité des thérapies à base de cellules souches.¹²⁴

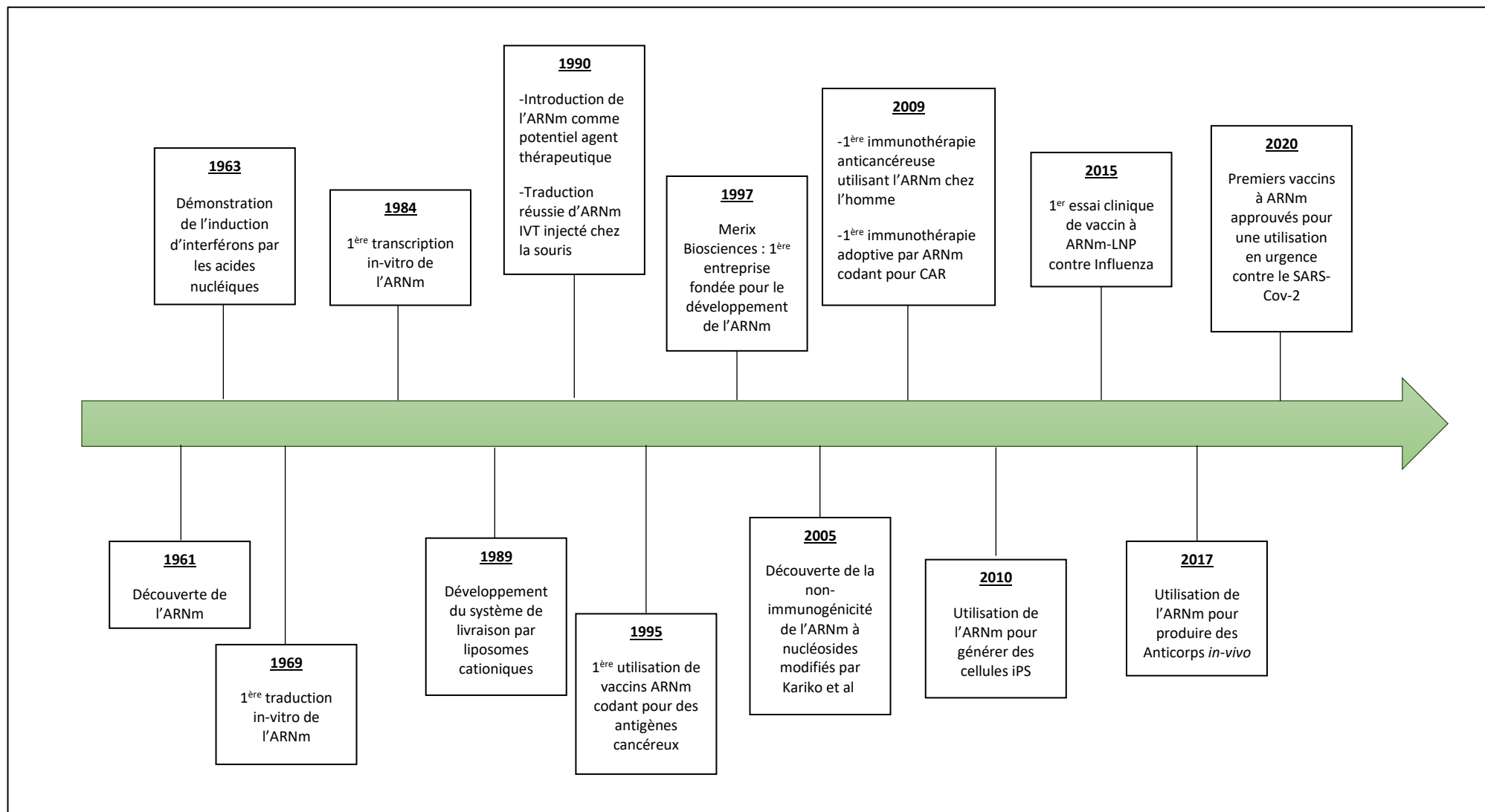
Conclusion

L'avenir des thérapies à base d'ARNm est prometteur ! Pendant des années, les médicaments à base d'ARN ont été étudiés avec intérêt en raison de leur large potentiel thérapeutique malgré le scepticisme en raison des préoccupations liées à l'immunogénicité. Heureusement, Karikó et d'autres scientifiques ont été les pionniers de la modification des nucléosides et des stratégies de conception de séquences qui permettent une expression robuste des protéines *in vivo*. L'instabilité de l'ARNm (perçue à l'origine comme le principal obstacle au développement de médicaments à base d'ARN) a été efficacement résolue. Il est possible d'obtenir une stabilité intracellulaire et d'augmenter la demi-vie de l'activité de traduction de l'ARNm de quelques minutes à quelques jours grâce à des éléments structurels qui modulent la traduction et le métabolisme de l'ARNm, et qui sont maintenant utilisés dans la conception d'ARNm IVT. La stabilité extracellulaire est traitée par le développement de formulations adaptées par exemple, la protamine et les supports nanoparticulaires (LNP).

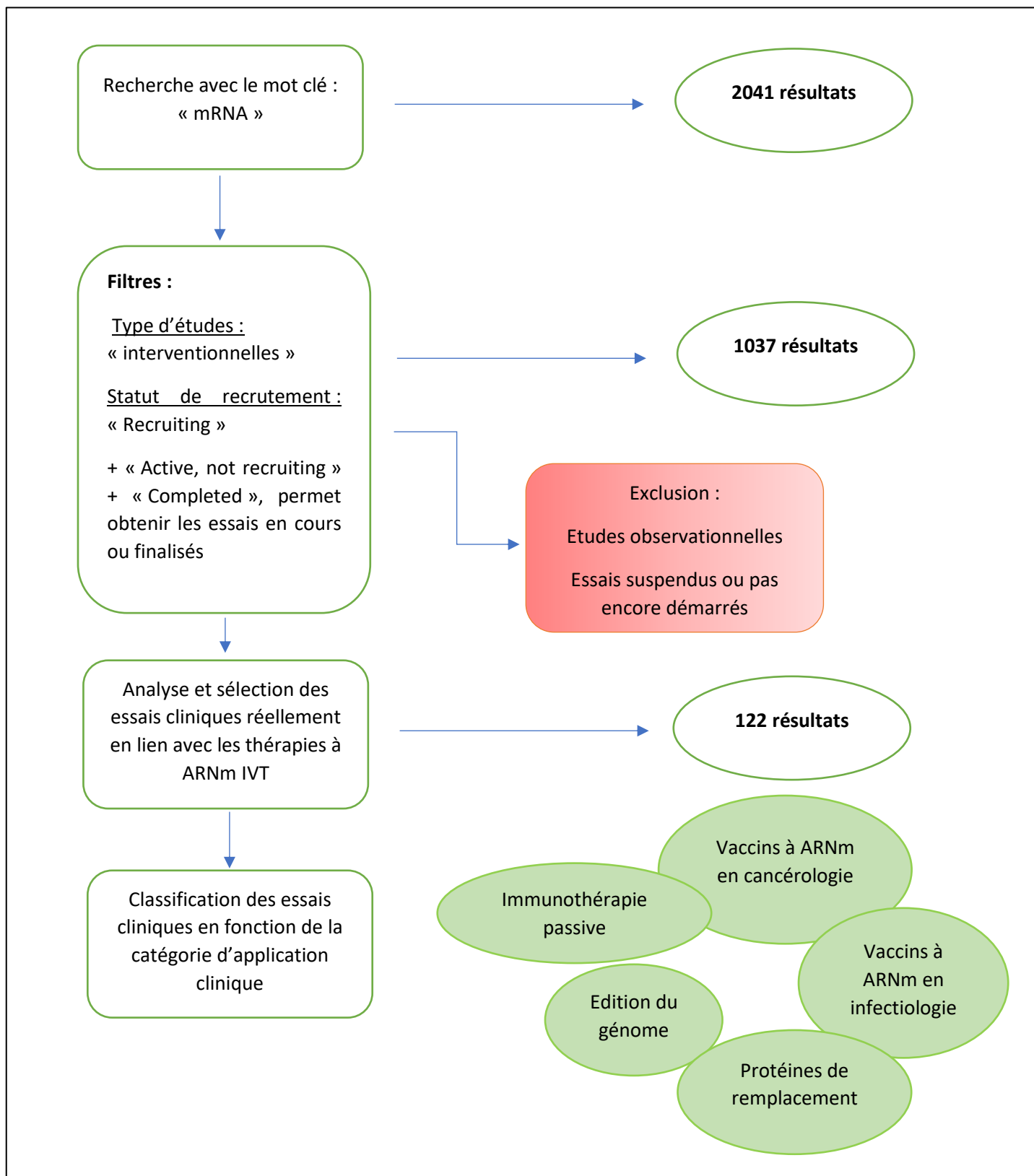
Durant la pandémie de SARS-CoV-2, des vaccins à base d'ARNm se sont révélés très efficaces contre le SARS-CoV-2 et ont été développés et administrés à une vitesse sans précédent à des millions de personnes dans le monde pour combattre la COVID-19. Ces vaccins, initialement développés par Pfizer-BioNTech et Moderna, ont prouvé la crédibilité de la plateforme et stimulé un intérêt substantiel pour l'application de l'ARNm dans des indications prophylactiques et thérapeutiques. Les données sur la sécurité et l'efficacité à long terme sont actuellement recueillies. Tant que ces derniers restent positifs, les obstacles aux thérapies à ARNm IVT livrés par nanoparticules lipidiques sont réduits.

Des milliards de dollars ont été déboursés depuis le succès des vaccins à ARNm contre le SARS-CoV-2 pour investir dans les entreprises travaillant sur les plateformes à ARNm. Aujourd'hui, Moderna, CureVac, Arcturus et d'autres sociétés ont des produits thérapeutiques et des vaccins à base d'ARNm en cours d'essais cliniques, avec des succès précoces.

Au cours des prochaines décennies, nous aurons probablement des traitements pour l'hémophilie, la drépanocytose et d'autres maladies rares. Nous aurons probablement des vaccins contre de nombreux agents pathogènes infectieux ou encore contre le cancer. Il faut s'attendre désormais à une flambée des essais cliniques utilisant des ARNm IVT.



Annexe 1: Les dates clés des découvertes et des avancées dans le développement de l'ARNm en thérapie



Annexe 2: Méthodologie d'extraction des données à partir du site ClinicalTrials.gov

NB : La liste des essais cliniques obtenue est non-exhaustive.

L'extraction des données a été faite à la date du 18 Février 2021.

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT05085366	A Study to Evaluate the Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1647 Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in Healthy Participants 16 to 40 Years of Age	Cytomegalovirus Infection	mRNA-1647	Phase 3	October 26, 2021
NCT05105048	A Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Cytomegalovirus (CMV) Vaccine mRNA-1647	Cytomegalovirus Infection	mRNA-1647	Phase 1	November 8, 2021
NCT04232280	Dose-Finding Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of Cytomegalovirus (CMV) Vaccine mRNA-1647 in Healthy Adults	Cytomegalovirus Infection	mRNA-1647	Phase 2	January 9, 2020
NCT03382405	Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Cytomegalovirus Vaccines mRNA-1647 and mRNA-1443 in Healthy Adults	Cytomegalovirus Infection	mRNA-1647 / mRNA-1443	Phase 1	November 13, 2017
NCT05164094	A Study of an Epstein-Barr Virus (EBV) Candidate Vaccine, mRNA-1189, in 18- to 30-Year-Old Healthy Adults	Epstein-Barr Virus Infection	mRNA-1189	Phase 1	December 28, 2021
NCT05001373	A Phase 1 Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of eOD-GT8 60mer mRNA Vaccine (mRNA-1644) and Core-g28v2 60mer mRNA Vaccine (mRNA-1644v2-Core)	HIV	Core-g28v2 60mer mRNA Vaccine <i>and</i> eOD-GT8 60mer mRNA Vaccine	Phase 1	November 12, 2021
NCT05217641	A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of BG505 MD39.3, BG505 MD39.3 gp151, and BG505 MD39.3 gp151 CD4KO HIV Trimer mRNA Vaccines in Healthy, HIV-	HIV Infections	BG505 MD39.3 mRNA / BG505 MD39.3 gp151 mRNA / BG505 MD39.3 gp151 CD4KO	Phase 1	February 11, 2022
NCT00833781	A Pilot Study of a Dendritic Cell Vaccine in HIV-1 Infected Subjects	HIV Infections	mRNA-transfected autologous dendritic cells	Phase 1 Phase 2	August 2009
NCT02413645	A Phase I, Open Label Dose Escalation Study to Evaluate Safety of iHIVARNA-01 in Chronically HIV-infected Patients Under Stable Combined Antiretroviral Therapy	HIV-infection	iHIVARNA-01	Phase 1	June 2015
NCT03392389	Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1653 in Healthy Adults	Human Metapneumovirus and Human Parainfluenza Infection	mRNA-1653	Phase 1	December 4, 2017
NCT04144348	Safety and Immunogenicity of mRNA-1653, a Combined Human Metapneumovirus (hMPV) and Parainfluenza Virus Type 3 (PIV3) Vaccine, in Healthy Adults, and Children 12 to 59 Months of Age	Human Metapneumovirus and Human Parainfluenza Infection	mRNA-1653	Phase 1	November 4, 2019
NCT03076385	Safety, Tolerability, and Immunogenicity of VAL-506440 in Healthy Adult Subjects	Influenza	VAL-506440	Phase 1	December 2015
NCT03829384	Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of mRNA-1944 in Healthy Adults	Prevention of Chikungunya Virus Infection	mRNA-1944	Phase 1	January 22, 2019
NCT03713086	A Study to Assess the Safety, Reactogenicity and Immune Response of CureVac's Candidate Rabies mRNA Vaccine in Healthy Adults	Rabies	mRNA vaccine CV7202	Phase 1	October 12, 2018
NCT02241135	RNAActive Rabies Vaccine (CV7201) in Healthy Adults	Rabies	CV7201 mRNA	Phase 1	October 2013
NCT05127434	A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of mRNA-1345 Vaccine Targeting Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Adults ≥60 Years of Age	Respiratory Syncytial Virus	mRNA-1345	Phase 2 Phase 3	November 17, 2021
NCT04528719	A Dose Escalation Study to Evaluate Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1345 in Healthy Adults and in Children Who Are Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Seropositive	Respiratory Syncytial Virus	mRNA-1345	Phase 1	September 30, 2020
NCT04956575	A Study of mRNA-1010 Seasonal Influenza Vaccine in Healthy Adults	Seasonal Influenza	mRNA-1010	Phase 1 Phase 2	July 6, 2021
NCT03014089	Safety, Tolerability, and Immunogenicity of mRNA-1325 in Healthy Adult Subjects	Zika Virus	mRNA-1325	Phase 1	December 21, 2016
NCT04917861	A Study of Zika Vaccine mRNA-1893 in Adult Participants Living in Endemic and Non-Endemic Flavivirus Areas	Zika Virus	mRNA-1893	Phase 2	June 8, 2021
NCT04064905	Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Zika Vaccine mRNA-1893 in Healthy Flavivirus Seropositive and Seronegative Adults	Zika Virus	mRNA-1893	Phase 1	July 30, 2019

Annexe 3: Essais cliniques des vaccins à ARNm contre les pathogènes hors SARS-COV2

NCT Number	Title	Interventions	Phases	Start Date
NCT04816643	A Phase 1/2/3 Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of an RNA Vaccine Candidate Against COVID-19 in Healthy Children and Young Adults	BNT162b2	Phase 3	March 24, 2021
NCT05231005	Fourth BNT162b2 COVID-19 Vaccine Dose	BNT162b2 vaccine	Phase 4	December 27, 2021
NCT04780659	COVID-19 Vaccination of Immunodeficient Persons (COVAXID)	Comirnaty mRNA vaccine	Phase 4	February 23, 2021
NCT04674189	A Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of Vaccine CVnCoV in Healthy Adults in Germany for COVID-19	CVnCoV Vaccine	Phase 3	December 23, 2020
NCT04765436	PTX-COVID19-B, an mRNA Humoral Vaccine, is Intended for Prevention of COVID-19 in a General Population. This Study is Designed to Evaluate Safety, Tolerability, and Immunogenicity	PTX-COVID19-B	Phase 1	January 14, 2021
NCT04889209	Delayed Heterologous SARS-CoV-2 Vaccine Dosing (Boost) After Receipt of EUA Vaccines	Ad26.COV2.S / BNT162b2/mRNA-1273/ mRNA-1273.211	Phase 1 Phase 2	May 28, 2021
NCT04785144	Safety and Immunogenicity Study of a SARS-CoV-2 (COVID-19) Variant Vaccine (mRNA-1273.351) in Naïve and Previously Vaccinated Adults	mRNA-1273 /mRNA-1273.351	Phase 1	March 29, 2021
NCT05057182	Third Dose of mRNA Vaccination to Boost COVID-19 Immunity (mBoost Study)	BNT162b2	Phase 4	October 18, 2021
NCT04951323	Impact of the Immune System on Response to Anti-Coronavirus Disease 19 (COVID-19) Vaccine in Allogeneic Stem Cell Recipients (Covid Vaccin Allo)	BNT162b2, Comirnaty	Phase 3	March 22, 2021
NCT05057169	Randomized Trial of COVID-19 Booster Vaccinations (Cobovax Study)	BNT162b2/ CoronaVac	Phase 4	November 18, 2021
NCT05132855	The Immune Response of Heterologous Boost Third Dose of mRNA and Protein COVID-19 Vaccine	BNT162b2/mRNA-1273 / MVC-COV1901	Phase 1 Phase 2	November 30, 2021
NCT04566276	ChulaCov19 Vaccine in Healthy Adults	ChulaCov19 vaccine	Phase 1 Phase 2	May 3, 2021
NCT04860739	Vaccination With COMIRNATY in Subjects With a VAXZEVRIA First Dose	COMIRNATY	Phase 2	April 24, 2021
NCT04800133	Covid-19 Vaccination in Adolescents and Children	Comirnaty (Tozinameran) / CoronaVac	Phase 2	May 8, 2021
NCT05022329	COVID-19 Vaccine Boosters in Patients With CKD	Comirnaty / MODERNA SARS-CoV-2 Vaccine	Phase 2 Phase 3	September 30, 2021
NCT05160766	Assessing Immune Response of Different COVID-19 Vaccines in Older Adults	Comirnaty(BTN162b2) /Spikevax (mRNA-1273)	Phase 2	November 8, 2021
NCT05019456	Exercise and COVID-19 Viral T-cell Immunity	COVID-19 Vaccine (mRNA or J&J)	Not Applicable	March 9, 2021
NCT05047718	Factors Influencing the COVID-19 Vaccine Immune Response According to Age and Presence or Not of a Past History of COVID-19	COVID-19 vaccine Pfizer /COVID-19 mRNA Vaccine Moderna	Phase 4	October 5, 2021
NCT04652102	A Study to Determine the Safety and Efficacy of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine CVnCoV in Adults for COVID-19	CVnCoV	Phase 2 Phase 3	December 14, 2020
NCT04515147	A Dose-Confirmation Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of Vaccine CVnCoV in Healthy Adults for COVID-19	CVnCoV	Phase 2	September 28, 2020
NCT04860258	A Study to Evaluate Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of the SARS-CoV-2 mRNA Vaccine CVnCoV in Adults With Co-morbidities for COVID-19	CVnCoV Vaccine	Phase 3	April 22, 2021
NCT04449276	A Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of Vaccine CVnCoV in Healthy Adults	CVnCoV Vaccine	Phase 1	June 18, 2020
NCT04863131	Safety and Immunogenicity of EXG-5003	EXG-5003	Phase 1 Phase 2	April 28, 2021
NCT05148962	Study of GRT-R910 COVID-19 Boost Vaccine in Healthy Volunteers	GRT-R910 10	Phase 1	September 16, 2021
NCT04761822	COVID19 SARS Vaccinations: Systemic Allergic Reactions to SARS-CoV-2 Vaccinations	Moderna and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine	Phase 2	April 7, 2021
NCT05168813	Efficacy Study of COVID-19 mRNA Vaccine in Regions With SARS-CoV-2 Variants of Concern	Moderna mRNA-1273	Phase 2 Phase 3	December 1, 2021

NCT Number	Title	Interventions	Phases	Start Date
NCT04969250	Vaccination for Recovered Inpatients With COVID-19 (VATICO)	Moderna mRNA-1273 / Pfizer BNT162b2	Phase 4	August 25, 2021
NCT04952402	SARS-CoV-2 Immune Responses After COVID-19 Therapy and Subsequent Vaccine	Moderna mRNA-1273 COVID-19 vaccine	Phase 4	July 16, 2021
NCT04283461	Safety and Immunogenicity Study of 2019-nCoV Vaccine (mRNA-1273) for Prophylaxis of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19)	mRNA-1273	Phase 1	March 16, 2020
NCT05079633	A Heterologous Prime-boost Study to Evaluate Immunogenicity and Safety of mRNA-1273 With MVC-COV1901 in Adults	mRNA-1273	Phase 4	September 30, 2021
NCT05030974	RECOVAC Third Vaccination Study	mRNA-1273 / Ad26.COV2.S vaccine	Phase 4	October 21, 2021
NCT05230953	Fourth COVID-19 Vaccine Dose- mRNA1273	mRNA1273 vaccine	Phase 3	January 5, 2022
NCT04885907	Third Dose of Moderna COVID-19 Vaccine in Transplant Recipients	mRNA-1273 vaccine	Phase 4	May 25, 2021
NCT04928456	Augmentation of Immune Response to COVID-19 mRNA Vaccination Through OMT With Lymphatic Pumps	Osteopathic Manipulative Treatment (OMT)	Not Applicable	June 11, 2021
NCT05175742	This Study is Designed to Demonstrate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of PTX-COVID19-B in Comparison to the Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine.	PTX-COVID19-B / Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine	Phase 2	August 17, 2021
NCT05060991	Impact of Immunosuppression Adjustment on COVID-19 Vaccination Response in Kidney Transplant Recipients	Reduction in antimetabolite immunosuppression	Phase 4	September 24, 2021
NCT04847102	A Phase III Clinical Study of a SARS-CoV-2 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Vaccine Candidate Against COVID-19 in Population Aged 18 Years and Above	SARS-CoV-2 mRNA Vaccine	Phase 3	July 22, 2021
NCT04798027	Study of mRNA Vaccine Formulation Against COVID-19 in Healthy Adults 18 Years of Age and Older	SARS-CoV-2 mRNA vaccine	Phase 1 Phase 2	March 12, 2021
NCT04860297	A Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of mRNA-1273 Vaccine to Prevent COVID-19 in Adult Organ Transplant Recipients and in Healthy Adult Participants	mRNA-1273	Phase 3	April 16, 2021
NCT04470427	A Study to Evaluate Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1273 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older to Prevent COVID-19	mRNA-1273	Phase 3	July 27, 2020
NCT04649151	A Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Effectiveness of mRNA-1273 Vaccine in Adolescents 12 to <18 Years Old to Prevent COVID-19	mRNA-1273	Phase 2 Phase 3	December 9, 2020
NCT04796896	A Study to Evaluate Safety and Effectiveness of mRNA-1273 COVID-19 Vaccine in Healthy Children Between 6 Months of Age and Less Than 12 Years of Age	mRNA-1273	Phase 2 Phase 3	March 15, 2021
NCT04927065	A Study to Evaluate the Immunogenicity and Safety of mRNA-1273.211 Vaccine for COVID-19 Variants	mRNA-1273.211	Phase 2 Phase 3	May 28, 2021
NCT04813796	A Study to Evaluate Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1283 and mRNA-1273 Vaccines in Healthy Adults Between 18 Years and 55 Years of Age to Dose-Confirmation Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1273 COVID-19 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older	mRNA-1283 / mRNA-1273	Phase 1	March 11, 2021
NCT04405076	A Study to Evaluate the Immunogenicity and Safety of mRNA-1283 COVID-19 Vaccine Boosters	mRNA-1273/ mRNA-1273.351	Phase 2	May 29, 2020
NCT05137236	A Study to Evaluate the Immunogenicity and Safety of mRNA-1283 COVID-19 Vaccine Boosters	mRNA-1283/mRNA-1283.211/mRNA-1273	Phase 2	December 6, 2021
NCT04523571	Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162b1) in Chinese Healthy Subjects	BNT162b1	Phase 1	July 28, 2020
NCT04649021	Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162b2) in Chinese Healthy Population	BNT162b2	Phase 2	December 4, 2020
NCT04811664	A Study of SARS CoV-2 Infection and Potential Transmission in Individuals Immunized With Moderna COVID-19 Vaccine	Moderna COVID-19 Vaccine	Phase 3	March 24, 2021
NCT04760132	National Cohort Study of Effectiveness and Safety of SARS-CoV-2/COVID-19 Vaccines (ENFORCE)	COMIRNATY/Moderna vaccine/ AstraZeneca vaccine	Phase 4	February 8, 2021
NCT04480957	Ascending Dose Study of Investigational SARS-CoV-2 Vaccine ARCT-021 in Healthy Adult Subjects	ARCT-021	Phase 1 Phase 2	May 2016

Annexe 4: Essais cliniques des Vaccins ARNm contre le SARS-CoV-2

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT01734304	DC Vaccination for Postremission Therapy in AML	Acute Myeloid Leukemia	DC vaccination	Phase 1 Phase 2	November 5, 2013
NCT01686334	Efficacy Study of Dendritic Cell Vaccination in Patients With Acute Myeloid Leukemia in Remission	Acute Myeloid Leukemia	DC vaccine	Phase 2	October 2012
NCT00834002	Dendritic Cell Vaccination for Patients With Acute Myeloid Leukemia in Remission	Acute Myeloid Leukemia (AML)	antigen-loaded cultured dendritic cells	Phase 1	March 2005
NCT04573140	A Study of RNA-lipid Particle (RNA-LP) Vaccines for Newly Diagnosed Pediatric High-Grade Gliomas (pHGG) and Adult Glioblastoma (GBM)	Adult Glioblastoma	Autologous total tumor mRNA and pp65-LAMP mRNA	Phase 1	October 26, 2021
NCT03788083	Intratumoral TriMix Injections in Early Breast Cancer Patients	Breast Cancer Female Early-stage Breast Cancer	Trimix	Phase 1	November 12, 2018
NCT00978913	Transfected Dendritic Cell Based Therapy for Patients With Breast Cancer or Malignant Melanoma	Breast Cancer Malignant Melanoma	DC vaccine	Phase 1	September 2009
NCT00228189	Carcinoembryonic Antigen-loaded Dendritic Cells in Advanced Colorectal Cancer Patients	Colorectal Cancer Liver Metastases	CEA-loaded dendritic cell vaccine	Phase 1 Phase 2	December 2003
NCT03396575	Brain Stem Gliomas Treated With Adoptive Cellular Therapy During Focal Radiotherapy Recovery Alone or With Dose-intensified Temozolomide (Phase I)	Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG) Brain Stem Glioma	TTRNA-DC vaccines with GM-CSF	Phase 1	August 2016
NCT05192460	Safety and Efficacy of Personalized Neoantigen Vaccine in Advanced Gastric Cancer, Esophageal Cancer and Liver Cancer	Gastric Cancer Esophageal Cancer Liver Cancer	neoantigen tumor vaccine with or without PD-1/L1	Not Applicable	February 2022
NCT03548571	Dendritic Cell Immunotherapy Against Cancer Stem Cells in Glioblastoma Patients Receiving Standard Therapy	Glioblastoma	Dendritic cell immunization / temozolomide	Phase 2 Phase 3	April 26, 2018
NCT03688178	DC Migration Study to Evaluate TReg Depletion In GBM Patients With and Without Varlilumab	Glioblastoma	Human CMV pp65-LAMP mRNA-pulsed autologous DCs	Phase 2	August 26, 2020
NCT02649582	Adjuvant Dendritic Cell-immunotherapy Plus Temozolomide in Glioblastoma Patients	Glioblastoma Multiforme of Brain	Dendritic cell vaccine plus temozolomide chemotherapy	Phase 1 Phase 2	December 2015
NCT00846456	Safe Study of Dendritic Cell (DC) Based Therapy Targeting Tumor Stem Cells in Glioblastoma	Glioblastoma Brain Tumor	Dendritic cell vaccine with mRNA from tumor stem cells	Phase 1 Phase 2	January 2009
NCT04911621	Adjuvant Dendritic Cell Immunotherapy for Pediatric Patients With High-grade Glioma or Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	High Grade Glioma Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	Biological: Dendritic cell vaccination + temozolomide-based	Phase 1 Phase 2	September 10, 2021
NCT02529072	Nivolumab With DC Vaccines for Recurrent Brain Tumors	Malignant Glioma Astrocytoma Glioblastoma	nivolumab / DC	Phase 1	January 2016
NCT00204516	Vaccination With Tumor mRNA in Metastatic Melanoma - Fixed Combination Versus Individual Selection of Targeted Antigens	Malignant Melanoma	mRNA coding for melanoma associated antigens / GM-CSF	Phase 1 Phase 2	April 2007
NCT00204607	Intradermal Vaccination With Stabilized Tumor mRNA - a Clinical Phase I/II Trial in Melanoma Patients	Malignant Melanoma	mRNA /Drug: GM-CSF	Phase 1 Phase 2	July 2004
NCT01278940	Trial of Vaccine Therapy With mRNA- Transfected Dendritic Cells in Patients With Advanced Malignant Melanoma	Malignant Melanoma	Dendritic Cells (DC)	Phase 1 Phase 2	March 2002
NCT01676779	mRNA Electroporated Autologous Dendritic Cells for Stage III/IV Melanoma	Malignant Melanoma Stage III Malignant Melanoma Stage IV	Dendritic cell therapy	Phase 2	October 2012
NCT00626483	Basiliximab in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme Undergoing Targeted Immunotherapy and Temozolomide-Caused	Malignant Neoplasms Brain	RNA-loaded dendritic cell vaccine / basiliximab	Phase 1	April 24, 2007
NCT00639639	Vaccine Therapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme	Malignant Neoplasms of Brain	autologous DCs / autologous lymphocytes	Phase 1	January 2006
NCT02649829	Autologous Dendritic Cell Vaccination in Mesothelioma	Malignant Pleural Mesothelioma	dendritic cell vaccination plus chemotherapy	Phase 1 Phase 2	August 1, 2017

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT03897881	An Efficacy Study of Adjuvant Treatment With the Personalized Cancer Vaccine mRNA-4157 and Pembrolizumab in Participants With High-Risk	Melanoma	mRNA-4157 /Pembrolizumab	Phase 2	July 18, 2019
NCT01456104	Immune Responses to Autologous Langerhans-type Dendritic Cells Electroporated With mRNA Encoding a Tumor-associated Antigen in Patients With Malignancy:	Melanoma	Langerhans-type dendritic cells	Phase 1	October 17, 2011
NCT01530698	Single-step Antigen Loading and TLR Activation of Dendritic Cells in Melanoma Patients	Melanoma	autologous dendritic cell vaccine	Phase 1 Phase 2	April 2010
NCT01066390	A Study on the Safety and Immunogenicity of Combined Intradermal and Intravenous Administration of an Autologous mRNA Electroporated Dendritic Cell Vaccine	Melanoma	TriMix-DC	Phase 1	December 2009
NCT00940004	Toll-like Receptor (TLR) Ligand Matured Dendritic Cell Vaccination in Melanoma Patients	Melanoma	autologous dendritic cell vaccination	Phase 1 Phase 2	June 2009
NCT02285413	Platin-based Chemotherapeutics to Enhance Dendritic Cell Vaccine Efficacy in Melanoma Patients	Melanoma	DC vaccination with cisplatin	Phase 2	February 2011
NCT00243529	Peptide-pulsed vs. RNA-transfected Dendritic Cell Vaccines in Melanoma Patients	Melanoma Stage III or IV	autologous dendritic cell vaccine	Phase 1 Phase 2	April 2004
NCT03164772	Phase 1/2 Study of Combination Immunotherapy and mRNA Vaccine in Subjects With NSCLC	Metastatic Non-small Cell Lung Cancer NSCLC	Durvalumab /Tremelimumab/ BI1361849	Phase 1 Phase 2	December 20, 2017
NCT01995708	CT7, MAGE-A3, and WT1 mRNA-electroporated Autologous Langerhans-type Dendritic Cells as Consolidation for Multiple Myeloma Patients	Multiple Myeloma	CT7, MAGE-A3, and WT1 mRNA in LC	Phase 1	January 31, 2014
NCT03083054	Cellular Immunotherapy for Patients With High Risk Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia	Myelodysplastic Syndromes Acute Myeloid Leukemia	Autologous dendritic cells electroporated with WT1 mRNA	Phase 1 Phase 2	August 2016
NCT03948763	A Study of mRNA-5671/V941 as Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab (V941-001)	Neoplasms Carcinoma, Non-Small-Cell Lung Pancreatic Neoplasms Colorectal	mRNA-5671-V941 /Pembrolizumab	Phase 1	June 26, 2019
NCT00923312	Trial of an RNAActive®-Derived Cancer Vaccine in Stage IIIB/IV Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)	Non Small Cell Lung Cancer	CV9201	Phase 1 Phase 2	May 2009
NCT04163094	Ovarian Cancer Treatment With a Liposome Formulated mRNA Vaccine in Combination With (Neo-)Adjuvant Chemotherapy	Ovarian Cancer	W_ova1 Vaccine	Phase 1	November 25, 2019
NCT01278914	Trial of Vaccine Therapy With mRNA- Transfected Dendritic Cells in Patients With Androgen Resistant Metastatic Prostate Cancer	Prostate Cancer	Dendritic Cells (DC)	Phase 1 Phase 2	
NCT01197625	Vaccine Therapy in Curative Resected Prostate Cancer Patients	Prostate Cancer	Dendritic cell vaccine	Phase 1 Phase 2	September 2010
NCT04382898	PRO-MERIT (Prostate Cancer Messenger RNA Immunotherapy)	Prostate Cancer	W_pro1 /Cemiplimab	Phase 1 Phase 2	December 19, 2019
NCT01446731	Dendritic Cell Vaccination and Docetaxel for Patients With Prostate Cancer	Prostatic Neoplasms	mRNA transfected dendritic cell / Docetaxel	Phase 2	October 2011
NCT00890032	Vaccine Therapy in Treating Patients Undergoing Surgery for Recurrent Glioblastoma Multiforme	Recurrent Central Nervous System Neoplasm	BTSC mRNA-loaded DCs	Phase 1	September 2009
NCT03739931	Dose Escalation Study of mRNA-2752 for Intratumoral Injection to Participants in Advanced Malignancies	Relapsed/Refractory Solid Tumor Malignancies or Lymphoma	mRNA-2752/ Durvalumab	Phase 1	November 27, 2018
NCT03323398	Dose Escalation and Efficacy Study of mRNA-2416 for Intratumoral Injection Alone and in Combination With Durvalumab for Participants With Advanced	Relapsed/Refractory Solid Tumor Malignancies or Lymphoma Ovarian Cancer	mRNA-2416 / Durvalumab	Phase 1 Phase 2	August 9, 2017
NCT03313778	Safety, Tolerability, and Immunogenicity of mRNA-4157 Alone in Participants With Resected Solid Tumors and in Combination With Pembrolizumab in Participants With	Solid Tumors	mRNA-4157 /Pembrolizumab	Phase 1	August 14, 2017

Annexe 5: Essais cliniques des vaccins à ARNm en cancérologie

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT04981691	Anti-mesothelin CAR-T Cells With Advanced Refractory Solid Tumors	Refractory Malignant Solid Neoplasm	anti-MESO CAR T cells	Phase 1	October 1, 2021
NCT01355965	Autologous Redirected RNA Meso-CIR T Cells	Malignant Pleural Mesothelioma	Autologous T cells	Phase 1	May 2011
NCT04683939	Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Preliminary Efficacy Trial of BNT141	Solid Tumor Gastric Cancer Metastatic Cancer	BNT141	Phase 1 Phase 2	January 18, 2022
NCT01897415	Autologous Redirected RNA Meso CAR T Cells for Pancreatic Cancer	Subjects With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDA)	Autologous T cells transfected with chimeric anti-mesothelin immunoreceptor SS1	Phase 1	July 2013
NCT02624258	Pilot Study of Non-Viral, RNA-Redirected Autologous T Cells in Patients With Refractory or Relapsed Hodgkin Lymphoma	Hodgkin Lymphoma	CD19 RNA redirected autologous T-cells (RNA CART19 cells)	Phase 1	November 2015
NCT02277522	CD19 Redirected Autologous T Cells for Hodgkin Lymphoma	Hodgkin Lymphoma With no Available Curative Treatment Options Who Have a Limited Prognosis	RNA anti-CD19 CAR T cells	Phase 1	October 2014

Annexe 6: Essais cliniques d'immunothérapie passive à ARNm IVT

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT04916431	A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of mRNA-6231 in Healthy Adults	Autoimmune disease	mRNA-6231	Phase 1	July 28, 2021
NCT05189925	NADPH Oxidase Correction in mRNA-transfected Granulocyte-enriched Cells in Chronic Granulomatous Disease (CGD)	Chronic Granulomatous	gp91 Grans	Phase 1	February 25, 2022
NCT05095727	A Study of mRNA-3745 in Participants With Glycogen Storage Disease Type 1a (GSD1a)	Glycogen Storage Disease	mRNA-3745	Phase 1	January 28, 2022
NCT03370887	AZD8601 Study in CABG Patients	Heart Failure	AZD8601	Phase 2	February 5, 2018
NCT02935712	Assessment of the Safety, Tolerability and Pharmacodynamics After Administration of One Dose of AZD8601 to Male Patients With Type II Diabetes Mellitus	Male Subjects With Type II Diabetes (T2DM)	AZD8602	Phase 1	December 16, 2016
NCT04899310	A Study to Assess Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of mRNA-3705 in Participants With Isolated Methylmalonic Acidemia	Methylmalonic Acidemia	mRNA-3705	Phase 1 Phase 2	August 6, 2021
NCT05130437	A Long-Term Extension Study to Evaluate the Safety and Clinical Activity of mRNA-3927	Propionic Acidemia	mRNA-3927	Phase 1 Phase 2	November 9, 2021
NCT04159103	Open-Label Study of mRNA-3927 in Participants With Propionic Acidemia	Propionic Acidemia	mRNA-3927	Phase 1 Phase 2	April 15, 2021

Annexe 7: Essais cliniques des protéines de remplacement codés par ARNm IVT

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Start Date
NCT02500849	Safety Study of Zinc Finger Nuclease CCR5-modified Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in HIV-1 Infected Patients	HIV	SB-728mR-HSPC Infusion	Phase 1	March 10, 2016
NCT03617198	CD4 CAR+ ZFN-modified T Cells in HIV Therapy	HIV	CD4 CAR+CCR5 ZFN T-cells	Phase 1	July 31, 2019
NCT02388594	A Phase I Study of T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728mR in HIV-Infected Patients	Human Immunodeficiency Virus (HIV)	ZFN Modified CD4+ T Cells / clophosphamide	Phase 1	April 2015
NCT04560790	Safety and Efficacy of CRISPR/Cas9 mRNA Instantaneous Gene Editing Therapy to Treat Refractory Viral Keratitis	Viral Keratitis Blindness Eye Herpes Simplex Virus Infection Cornea	BD111	Phase 1 Phase 2	November 4, 2020

Annexe 8: Essais cliniques des éditions du génome à ARNm IVT

Bibliographie :

1. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759-780. doi:10.1038/nrd4278
2. April 2021 15. The history of mRNA applications. The DNA Universe BLOG. Published April 15, 2021. Accessed March 27, 2022. <https://the-dna-universe.com/2021/04/15/the-history-of-mrna-applications/>
3. Woodson SA, Leontis NB. Structure and dynamics of ribosomal RNA. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8(3):294-300. doi:10.1016/S0959-440X(98)80061-4
4. Pan T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA. *Cell Res.* 2018;28(4):395-404. doi:10.1038/s41422-018-0013-y
5. Tollervey D, Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(3):337-342. doi:10.1016/S0955-0674(97)80005-1
6. Hernandez N. Small Nuclear RNA Genes: a Model System to Study Fundamental Mechanisms of Transcription *. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26733-26736. doi:10.1074/jbc.R100032200
7. Peric D. Etude fonctionnelle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales. :215.
8. Monga I, Banerjee I. Computational Identification of piRNAs Using Features Based on RNA Sequence, Structure, Thermodynamic and Physicochemical Properties. *Curr Genomics.* 2019;20(7):508-518. doi:10.2174/1389202920666191129112705
9. Zhu M, Liu J, Xiao J, et al. Lnc-mg is a long non-coding RNA that promotes myogenesis. *Nat Commun.* 2017;8(1):14718. doi:10.1038/ncomms14718
10. Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(3):158-174. doi:10.1038/nrm.2017.103
11. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 2005;361:13-37. doi:10.1016/j.gene.2005.06.037
12. Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(10):a034728. doi:10.1101/cshperspect.a034728
13. Hesketh J. 3' UTRs and Regulation. In: *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005. doi:10.1038/npg.els.0005011
14. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002;3(3):reviews0004.1. doi:10.1186/gb-2002-3-3-reviews0004
15. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(21):3613-3634. doi:10.1007/s00018-012-0990-9
16. Sieber P, Platzer M, Schuster S. The Definition of Open Reading Frame Revisited. *Trends Genet.* 2018;34(3):167-170. doi:10.1016/j.tig.2017.12.009
17. Tang TT, Stowell JA, Hill CH, Passmore LA. The intrinsic structure of poly(A) RNA determines the specificity of Pan2 and Caf1 deadenylases. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6):433-442. doi:10.1038/s41594-019-0227-9
18. Mure F. *Rôle de La Protéine EB2 Du Virus d'Epstein-Barr Dans Le Métabolisme Des ARN Messagers.* 2016.
19. Rougemaille M, Villa T, Gudipati RK, Libri D. mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biol Cell.* 2008;100(6):327-342. doi:10.1042/BC20070143
20. Passmore LA, Collier J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(2):93-106. doi:10.1038/s41580-021-00417-y
21. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol Ther.* 2019;27(4):757-772. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.020
22. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol Ther.* 2018;26(2):446-455. doi:10.1016/j.ymthe.2017.11.017

23. Minnaert AK, Vanluchene H, Verbeke R, et al. Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: Getting the message across. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;176:113900. doi:10.1016/j.addr.2021.113900
24. Brito LA, Chan M, Shaw CA, et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2014;22(12):2118-2129. doi:10.1038/mt.2014.133
25. Beissert T, Perkovic M, Vogel A, et al. A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Mol Ther.* 2020;28(1):119-128. doi:10.1016/j.ymthe.2019.09.009
26. Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Controlled Release.* 2016;240:227-234. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.032
27. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther.* 2019;27(4):710-728. doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.012
28. Trepotec Z, Lichtenegger E, Plank C, Aneja MK, Rudolph C. Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases. *Mol Ther.* 2019;27(4):794-802. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.012
29. Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther.* 2019;27(4):735-746. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.014
30. Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther.* 2017;24(3):133-143. doi:10.1038/gt.2017.5
31. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(1):46-60. doi:10.2174/1389201011314010008
32. Ren S, Li M, Smith JM, DeTolla LJ, Furth PA. Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC Biotechnol.* 2002;2:10. doi:10.1186/1472-6750-2-10
33. Uchida M, Natsume H, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y. Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios gun system. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(5):690-693. doi:10.1248/bpb.25.690
34. McMahon JM, Wells DJ. Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* 2004;18(3):155-165. doi:10.2165/00063030-200418030-00002
35. Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2007;15(12):2063-2069. doi:10.1038/sj.mt.6300314
36. Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater.* Published online August 10, 2021:1-17. doi:10.1038/s41578-021-00358-0
37. Bao Y, Jin Y, Chivukula P, et al. Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes. *Pharm Res.* 2013;30(2):342-351. doi:10.1007/s11095-012-0874-6
38. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv.* 2016;7(5):319-334. doi:10.4155/tde-2016-0006
39. Li B, Zhang X, Dong Y. Nanoscale platforms for messenger RNA delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2019;11(2):e1530. doi:10.1002/wnan.1530
40. Kranz LM, Diken M, Haas H, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* 2016;534(7607):396-401. doi:10.1038/nature18300
41. Anttila V, Saraste A, Knuuti J, et al. Synthetic mRNA Encoding VEGF-A in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: Design of a Phase 2a Clinical Trial. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:464-472. doi:10.1016/j.omtm.2020.05.030
42. Kreiter S, Selmi A, Diken M, et al. Intranodal Vaccination with Naked Antigen-Encoding RNA Elicits Potent Prophylactic and Therapeutic Antitumoral Immunity. *Cancer Res.* 2010;70(22):9031-9040. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0699
43. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 2017;547(7662):222-226. doi:10.1038/nature23003

44. Gagliardi D, Dziembowski A. 5' and 3' modifications controlling RNA degradation: from safeguards to executioners. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018;373(1762):20180160. doi:10.1098/rstb.2018.0160
45. Charenton C, Graille M. mRNA decapping: finding the right structures. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018;373(1762):20180164. doi:10.1098/rstb.2018.0164
46. Wiederhold K, Passmore LA. Cytoplasmic deadenylation: Regulation of mRNA fate. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(6):1531-1536. doi:10.1042/BST0381531
47. Murchison EP. RNAases. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013:270. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01355-3
48. Vlatkovic I. Non-Immunotherapy Application of LNP-mRNA: Maximizing Efficacy and Safety. *Biomedicines.* 2021;9(5):530. doi:10.3390/biomedicines9050530
49. Mu X, Hur S. Immunogenicity of In Vitro-Transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021;54(21):4012-4023. doi:10.1021/acs.accounts.1c00521
50. Weissman D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14(2):265-281. doi:10.1586/14760584.2015.973859
51. Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther.* 2010;17(8):961-971. doi:10.1038/gt.2010.52
52. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* 2012;9(11):1319-1330. doi:10.4161/rna.22269
53. Stepinski J, Waddell C, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA.* 2001;7(10):1486-1495.
54. N. Kuhn A, Beißert T, Simon P, et al. mRNA as a Versatile Tool for Exogenous Protein Expression. *Curr Gene Ther.* 2012;12(5):347-361. doi:10.2174/156652312802762536
55. Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, et al. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. *RNA Biol.* 2018;15(6):756-762. doi:10.1080/15476286.2018.1450054
56. Sample PJ, Wang B, Reid DW, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nat Biotechnol.* 2019;37(7):803-809. doi:10.1038/s41587-019-0164-5
57. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2019;27(4):824-836. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
58. Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Controlled Release.* 2015;217:337-344. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.051
59. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2):165-175. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
60. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol Ther.* 2008;16(11):1833-1840. doi:10.1038/mt.2008.200
61. Baierdörfer M, Boros G, Muramatsu H, et al. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2019;15:26-35. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.018
62. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* 2015;15(11):7300-7306. doi:10.1021/acs.nanolett.5b02497
63. Sago CD, Lokugamage MP, Paunovska K, et al. High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(42):E9944-E9952. doi:10.1073/pnas.1811276115
64. Chen S, Zaifman J, Kulkarni JA, et al. Dexamethasone prodrugs as potent suppressors of the immunostimulatory effects of lipid nanoparticle formulations of nucleic acids. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2018;286:46-54. doi:10.1016/j.jconrel.2018.07.026
65. Konarska MM, Padgett RA, Sharp PA. Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell.* 1984;38(3):731-736. doi:10.1016/0092-8674(84)90268-x

66. Arnaud-Barbe N, Cheynet-Sauvion V, Oriol G, Mandrand B, Mallet F. Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(15):3550-3554.
67. Wu MZ, Asahara H, Tzertzinis G, Roy B. Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature in vitro transcription. *RNA N Y N.* 2020;26(3):345-360. doi:10.1261/rna.073858.119
68. Xia H, Jiang Y, Cheng R, et al. *In Vitro Transcription Using Psychrophilic Phage VSW-3 RNA Polymerase.* Molecular Biology; 2020. doi:10.1101/2020.09.14.297226
69. Mu X, Greenwald E, Ahmad S, Hur S. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(10):5239-5249. doi:10.1093/nar/gky177
70. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):e142. doi:10.1093/nar/gkr695
71. Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y, Wei X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer.* 2021;20:33. doi:10.1186/s12943-021-01311-z
72. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature.* 2017;543(7644):248-251. doi:10.1038/nature21428
73. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:594. doi:10.3389/fimmu.2019.00594
74. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* Published online August 25, 2021:1-22. doi:10.1038/s41573-021-00283-5
75. Beck JD, Reidenbach D, Salomon N, et al. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Mol Cancer.* 2021;20:69. doi:10.1186/s12943-021-01348-0
76. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
77. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, et al. From Allergen Genes to Allergy Vaccines. *Annu Rev Immunol.* 2010;28(1):211-241. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101218
78. Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, et al. Immunize and disappear—Safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):1070-1077.e11. doi:10.1016/j.jaci.2009.06.036
79. Prophylactic mRNA vaccination against allergy - PubMed. Accessed February 23, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20856111/>
80. Weiss R, Scheiblhofer S, Thalhamer J. Allergens are not pathogens. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(3):703-707. doi:10.4161/hv.27183
81. Granot-Matok Y, Kon E, Dammes N, Mechtlinger G, Peer D. Therapeutic mRNA delivery to leukocytes. *J Controlled Release.* 2019;305:165-175. doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.032
82. Immunogénicité des vaccins - Immunologie de la vaccination - Professionnels de la santé - MSSS. Accessed February 24, 2022. <https://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/vaccination/piq-immunologie-de-la-vaccination/immunogenicite-des-vaccins/>
83. Kowalczyk A, Doener F, Zanzinger K, et al. Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity. *Vaccine.* 2016;34(33):3882-3893. doi:10.1016/j.vaccine.2016.05.046
84. Edwards DK, Jasny E, Yoon H, et al. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J Transl Med.* 2017;15:1. doi:10.1186/s12967-016-1111-6
85. Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, Verrier B. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. *Trends Mol Med.* 2020;26(3):311-323. doi:10.1016/j.molmed.2019.10.002
86. Nagy A, Alhatlani B. An overview of current COVID-19 vaccine platforms. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:2508-2517. doi:10.1016/j.csbj.2021.04.061
87. Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J Pharm Sci.* 2021;110(3):997-1001. doi:10.1016/j.xphs.2020.12.006

88. Kim YC, Dema B, Reyes-Sandoval A. COVID-19 vaccines: breaking record times to first-in-human trials. *NPJ Vaccines*. 2020;5:34. doi:10.1038/s41541-020-0188-3
89. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs*. 2021;81(4):495-501. doi:10.1007/s40265-021-01480-7
90. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci*. 2021;17(6):1446-1460. doi:10.7150/ijbs.59233
91. Brown RB. Outcome Reporting Bias in COVID-19 mRNA Vaccine Clinical Trials. *Medicina (Mex)*. 2021;57(3):199. doi:10.3390/medicina57030199
92. Dossier thématique - COVID-19 - Vaccins autorisés - ANSM. Accessed February 28, 2022. <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/covid-19-vaccins/covid-19-vaccins-autorises>
93. CovidTracker - Suivez l'épidémie de Covid19 en France et dans le monde. CovidTracker. Accessed February 28, 2022. <https://covidtracker.fr/>
94. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1996;184(2):465-472. doi:10.1084/jem.184.2.465
95. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*. 1995;55(7):1397-1400.
96. Krug C, Wiesinger M, Abken H, et al. A GMP-compliant protocol to expand and transfect cancer patient T cells with mRNA encoding a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(10):999-1008. doi:10.1007/s00262-014-1572-5
97. Thran M, Mukherjee J, Pönisch M, et al. mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors. *EMBO Mol Med*. 2017;9(10):1434-1447. doi:10.15252/emmm.201707678
98. Chames P, Wurch T. Les anticorps et scaffold bispécifiques, des médicaments innovants en oncologie impliquant le ciblage des cellules immunitaires. *médecine/sciences*. 2019;35(12):1072-1082. doi:10.1051/medsci/2019242
99. Svoboda J, Rheingold SR, Gill SI, et al. Nonviral RNA chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;132(10):1022-1026. doi:10.1182/blood-2018-03-837609
100. Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):26-31. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0006
101. Lee MJ, Lee I, Wang K. Recent Advances in RNA Therapy and Its Carriers to Treat the Single-Gene Neurological Disorders. *Biomedicines*. 2022;10(1):158. doi:10.3390/biomedicines10010158
102. Huang L, Zhang L, Li W, et al. Advances in Development of mRNA-Based Therapeutics. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer; :1-20. doi:10.1007/82_2020_222
103. Kolarich D, Weber A, Turecek PL, Schwarz HP, Altmann F. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics*. 2006;6(11):3369-3380. doi:10.1002/pmic.200500751
104. Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*. 1999;848(1-2):45-62. doi:10.1016/s0006-8993(99)01909-5
105. Fattori E, Cappelletti M, Zampaglione I, et al. Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J Gene Med*. 2005;7(2):228-236. doi:10.1002/jgm.652
106. Roberts SA, Dong B, Firman JA, Moore AR, Sang N, Xiao W. Engineering Factor VIII for Hemophilia Gene Therapy. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011;1:S1-006. doi:10.4172/2157-7412.S1-006
107. Gan LM, Lagerström-Fermér M, Carlsson LG, et al. Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes. *Nat Commun*. 2019;10:871. doi:10.1038/s41467-019-08852-4
108. ModernaTX, Inc. *A Global, Phase 1/2, Open-Label, Dose Optimization Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics of MRNA-3705 in Participants With Isolated Methylmalonic Acidemia Due to Methylmalonyl-CoA Mutase Deficiency*. clinicaltrials.gov; 2021. Accessed March 10, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04899310>
109. Jiang L, Park JS, Yin L, et al. Dual mRNA therapy restores metabolic function in long-term studies in mice with propionic acidemia. *Nat Commun*. 2020;11(1):5339. doi:10.1038/s41467-020-19156-3

110. gene editing | Definition, History, & CRISPR-Cas9 | Britannica. Accessed March 9, 2022. <https://www.britannica.com/science/gene-editing>
111. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *médecine/sciences*. 2015;31(11):1014-1022. doi:10.1051/medsci/20153111016
112. Kuritzkes DR. Hematopoietic stem cell transplantation for HIV cure. *J Clin Invest*. 2016;126(2):432-437. doi:10.1172/JCI80563
113. A V. Unique Properties of Stem Cells. *Res Rev J Pharmacol Toxicol Stud*. 2016;4(3):1-10.
114. Surat P. Stem Cell Sources, Types, and Uses in Research. News-Medical.net. Published July 1, 2019. Accessed February 16, 2022. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Stem-Cell-Sources-Types-and-Uses-in-Research.aspx>
115. Bindu A H, B S. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther*. 2011;01(03). doi:10.4172/2157-7633.1000115
116. Sources of Adult Stem Cells. Stem Cell Institute. Accessed February 16, 2022. <https://www.cellmedicine.com/sources-of-adult-stem-cells/>
117. Cellules souches pluripotentes induites (IPS) - Inserm, La science pour la santé. Inserm. Accessed February 16, 2022. <https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-pluripotentes-induites-ips/>
118. Bindhya S, Sidhanth C, Shabna A, Krishnapriya S, Garg M, Ganesan TS. Induced pluripotent stem cells: A new strategy to model human cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;107:62-68. doi:10.1016/j.biocel.2018.12.008
119. Saha B, Borgohain MP, Dey C, Thummer RP. iPS Cell Generation: Current and Future Challenges. 2018;1(2):4.
120. Wiegand C, Banerjee I. Recent advances in the applications of iPSC technology. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;60:250-258. doi:10.1016/j.copbio.2019.05.011
121. Borgohain MP, Haridhasapavalan KK, Dey C, Adhikari P, Thummer RP. An Insight into DNA-free Reprogramming Approaches to Generate Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells for Prospective Biomedical Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2019;15(2):286-313. doi:10.1007/s12015-018-9861-6
122. Warren L, Lin C. mRNA-Based Genetic Reprogramming. *Mol Ther*. 2019;27(4):729-734. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.009
123. Chabanovska O, Galow AM, David R, Lemcke H. mRNA – A game changer in regenerative medicine, cell-based therapy and reprogramming strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;179:114002. doi:10.1016/j.addr.2021.114002
124. Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(1):142-154. doi:10.1007/s12015-021-10262-3
125. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):523-531. doi:10.1016/j.stem.2020.09.014

Auteur : GAHBICHE Inès

Titre : L'ARN messenger, une épopée salvatrice

RESUME

L'ARN messenger transcrit *in vitro* a récemment accédé à un nouveau statut de médicament et a suscité l'enthousiasme de la communauté scientifique et du grand public. Les nombreux travaux scientifiques visant à optimiser sa structure (augmentation de sa stabilité et diminution de son immunogénicité), à standardiser les méthodes de synthèse et améliorer les techniques de transfection dans les cellules cibles ont permis à l'ARNm d'être utilisé pour la prévention ou le traitement de certaines pathologies chez l'homme. Les principaux domaines thérapeutiques explorés incluent les vaccins en infectiologie et en cancérologie, les immunothérapies ou les thérapies de remplacement. Dans le futur, les ARNm pourraient même être utilisés pour des thérapies innovantes de médecine régénérative faisant intervenir l'édition du génome et la reprogrammation cellulaire. Le potentiel de l'ARNm en tant qu'agent thérapeutique et prophylactique a été mis en lumière par le bénéfice sociétal des vaccins BNT-162 et mRNA-1273.

Title: Messenger RNA, a saving grace

ABSTRACT

In vitro transcribed messenger RNA has been put in the spotlight these recent years thanks to its new drug status. The numerous scientific studies aiming to optimize its structure (increase of its stability and decrease of its immunogenicity), to standardize the synthesis methods and to improve the transfection techniques in target cells have allowed mRNA use for the prevention or the treatment of certain pathologies in humans. The main therapeutic areas explored include vaccines in infectious diseases and cancer, immunotherapies, or replacement therapies. In the future, mRNAs could even be used for innovative regenerative medicine therapies involving genome editing and cellular reprogramming. The potential of mRNA as a therapeutic and prophylactic agent has been highlighted by the societal benefit of BNT-162 and mRNA-1273 vaccines.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : ARNm IVT ; immunogénicité des ARNm, thérapies à ARNm ; vaccin à ARNm ; immunothérapie ; thérapies de remplacement ; édition du génome

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
35 CHEMIN DES MARAICHERS 31062
TOULOUSE CEDEX 9

Directrice de thèse : Pr. COUDERC Bettina