

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE 2021-2022

N° 2020* - 27

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par
Mr Akram BERKANI

Présentée et soutenue publiquement le 12 septembre 2022

L'optimisation des vaccins à ARN messagers

Président : **Mr Jean Michel Robert**, Professeur de Chimie Médicinale & Drug Discovery, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Directeur de thèse : **Mr Stéphane Birklé**, Professeur d'Immunologie et de Biotechnologies, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Membres du jury : **Mme Sophie Fougeray**, Maître de conférences en Immunologie et de Biotechnologies, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Latifa Rbah-Vidal, Maître de conférences de Pharmacocinétique, Pharmacologie et Imagerie pré-clinique, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Remerciements

À toutes les personnes m'ayant soutenu tout au long de mes études

Mr Jean Michel Robert : Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury.

Mr Stéphane Birklé : Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse et de m'avoir accompagné tout au long de ma rédaction. Vos conseils et corrections m'ont été d'une aide précieuse. Je vous remercie du temps que vous m'avez accordé et des discussions que nous avons pu avoir autour de ce sujet.

À mes professeurs et amis de l'université

Je vous remercie tous d'avoir fait partie de cette aventure exceptionnelle qui m'a permis de rencontrer des professeurs exceptionnels qui nous ont enseigné des notions avec tant de rigueur et de passion. Merci à mes amis, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, qui m'ont permis d'évoluer et de dépasser mes limites : **Ken Schmid, Mohamed Ali Harrathi, Imani Younoussa, Yovil Yotchev, Théo Charnois, Adam Mouhib, Hicham El Hannati, Alberic Lequeux, Alexandre Devaux, Victoire Lepelletier, Vincent Ruvicini, Mael Khoja, Romain Richard, Inès Vallet, Clara Joudon et bien d'autres ...**

À mes amis proches

Axel L. : Merci pour ces dix années d'amitié. On a grandi ensemble et on s'est vu évoluer dans différents secteurs. Pourtant, on est resté amis et grâce à tes conseils, tu m'as permis de garder le cap tout au long de mes études.

Samy N. : Je te remercie pour ton amitié sincère et pour tes conseils. Tu m'as beaucoup aidé à rester motivé cette année.

Amy et Laurie : On rencontre rarement des personnes aussi gentilles, inspirantes et humbles. Je vous remercie d'avoir fait partie de cette aventure et de m'avoir soutenu ces deux dernières années.

Shadé F. : On ne fait jamais de rencontre par hasard et je suis chanceux d'avoir croisé ton regard. Je te remercie de m'avoir soutenu et encouragé pendant ces moments difficiles. Tu m'as permis de me dépasser et de croire en moi sans rien attendre en retour. Merci d'avoir été présente.

Yacine R. : Tu as été et restera un ami précieux. Je te remercie d’avoir été présent, et d’avoir cru en moi. Je te remercie pour tous ces moments passés ensemble à rigoler et à partager notre passion ensemble.

Inès M. : Après 14 ans d’amitié, tu n’as jamais cessé de croire en moi. Je te remercie d’être une amie fidèle.

Lauren & Austin: *You’re the most beautiful people I have ever met. Thank you for your tremendous support during my experience in Ireland. You made me discover a side of myself and made me grow as a person.*

Sanofi Waterford (MSAT team): *I am grateful to have been a member of the MSAT lab team last year; you were like my family in Ireland. Thank you for your advice, guidance, and support.*

À ma famille

Oussama Danyl Berkani : J’aimerais te remercier pour tous ces moments passés ensemble et pour la foi incontestable que tu as eue en moi. Nos vacances ensemble ont été les plus beaux souvenirs et sources de motivation pour enchaîner ce cycle d’études. Je te remercie de m’avoir permis de relever la pente par moments, d’avoir été une source d’inspiration et d’avoir été un frère à la hauteur de mes espérances.

Papa : Je te remercie de m’avoir inspiré et motivé à me lancer dans ces études grâce à ta carrière prodigieuse. Merci d’avoir été présent dans les bons moments comme dans les moments difficiles. J’ai beaucoup appris par ta sagesse d’esprit et tes conseils. Merci papa.

Maman : Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Tout au long de mes études, et depuis ma naissance, tu n’as jamais cessé de croire en moi et en mes capacités. Merci pour ton soutien, ta présence, ton investissement, ton amour et tes conseils. Tu es la raison de tous mes accomplissements. Tu as traversé à mes côtés 7 années d’études, d’obstacles, de stress, de déception, d’espoir et de joie. Merci pour tout.

Je vous dédie cette thèse, pour vous remercier d’avoir cru en moi.

À tous ceux qui ne sont pas cités

À toutes les personnes qui ne sont pas citées plus haut, et qui ont été présentes pour moi ou qui m’ont apporté un soutien tout au long de mes études ou même pour une brève durée. Je ne vous ai pas oublié, je vous remercie de tout mon cœur, et sans vous je n’y serai jamais arrivé.

« Nous ne faisons pas de nouvelles rencontres par accident. Elles sont destinées à croiser notre chemin pour une raison » alors merci à vous tous.

Citations qui m'ont inspiré tout au long de mes études

"You can't put a limit on anything. The more you dream, the farther you get. " :

Michael Phelps

"He who is not courageous enough to take risks will accomplish nothing in life." :

Mohamed Ali

"Don't ever let someone tell you: "You can't do something." Not even me. All right? You got a dream... You gotta protect it. People can't do something themselves, they wanna tell you "You can't do it." If you want something, go get it. Period":

Will Smith (*The pursuit of Happiness*)

"Life's not about how hard of a hit you can give... It's about how many you can take and keep moving forward. ":

Sylvester Stallone (*Rocky*)

"Wherever the art of medicine is loved, there is also a love of humanity»:

Hippocrates

"Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world":

Louis Pasteur



Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	FONCTION BIOLOGIQUE DE L'ARN _M	2
1.2	ARN _M ET INNOVATIONS THERAPEUTIQUES	4
1.2.1	<i>Immunothérapie cancéreuse</i>	5
1.2.2	<i>Vaccinations utilisant l'ARN_m</i>	7
1.3	LA MOLECULE D'ARN MESSAGER : ORIGINE ET STRUCTURE	14
1.3.1	<i>La formation d'ARN pré-messager</i>	15
1.3.2	<i>La maturation de l'ARN pré-messager pour donner un ou plusieurs ARNm</i>	16
2	REGAIN D'INTERET DES VACCINS A ARN_M	18
2.1	LES MECANISMES DE RECONNAISSANCES DES ARN _M PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	18
2.1.1	<i>La réponse interféron</i>	18
2.1.2	<i>La voie RLR-MAVS</i>	23
2.2	LES INNOVATIONS QUI ONT PERMIS LE DEVELOPPEMENT DES VACCINS A ARN _M	25
2.2.1	<i>Le procédé de production in vitro et les éléments clés de l'ARN_m</i>	25
2.2.2	<i>Systèmes de délivrances</i>	31
3	MODE D'ACTION DES VACCINS A ARN_M.....	38
3.1	CRITERES D'IMMUNOGENICITE ET D'EVALUATION DES VACCINS ANTI-SARS-CoV-2.....	39
3.1.1	<i>Les vaccins à ARNm au service de la pandémie du SARS-CoV-2</i>	41
3.1.2	<i>L'immunogénicité des vaccins à ARNm</i>	43
3.2	LIMITES	46
3.3	INNOVATIONS ET OPTIMISATIONS DES VACCINS A ARN _M FACE AUX LIMITES	47
4	ELARGISSEMENT DES COMPETENCES VACCINALES DU PHARMACIEN D'OFFICINE... 57	
4.1	PREVENTION DES RISQUES INFECTIEUX	57
4.2	PRESCRIPTION ET ADMINISTRATION DES VACCINS	58
4.3	TRANSPORT, STOCKAGE & DISTRIBUTION.....	59
4.4	ACTES DE PREVENTION.....	59
5	PERSPECTIVES D'OPTIMISATION DES VACCINS A BASE D'ARN_M	60

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNpol	ARN polymérase
CAR	<i>Chimeric Antibody Receptor</i> / Récepteur antigénique chimérique
COVID-19	<i>Coronavirus Disease-19</i> / Maladie du coronavirus 19
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CryoME	Cryo-microscopie électronique
IL	Interleukine
IFN	Interferon
eIF	Facteur d'initiation eucaryote
LT	Lymphocytes T
LB	Lymphocytes B
LNP	Nanoparticule Lipidique
mab	Anticorps monoclonal
miARN	micro ARN
ORF	<i>Open Reading Frame</i> / Cadre ouvert de lecture
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PAT	<i>Process Analytical Technology</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> / Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
QbD	<i>Quality by Design</i> / Design par la qualité
R&D	Recherche & Développement
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus 2</i> / Syndrome aigu respiratoire sévère – Coronavirus 2
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte colony stimulating factor</i> / Facteur de stimulation de colonies de granulocytes et de monocytes

saRNA	<i>Self-amplifying RNA</i> / ARN réplcatifs
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> / Petit ARN interférent
LTfh	<i>Lymphocyte T follicular helper</i> / lymphocyte T auxiliaire folliculaire
Th (1/2)	<i>T helper (1/ 2)</i> / T auxiliaires (1/2)
TF	Facteur de transcription
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> / Facteur de nécrose tumorale
TT	<i>Technology Transfer</i> / Transfert de technologie
UTR	<i>Untranslated region</i> / Région non traduite
RIG-I	<i>Retinoic Acid-inducible gene I</i> / Gène I inductible par l'acide rétinoïque
RLR	<i>RIG-I like receptors</i> / Récepteurs de type RIG-I
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> / Récepteurs de type Toll

Liste des tableaux et des figures

Figure 1. Organisation de la traduction d'un ARNm en protéine (3)	3
Figure 2. Illustration de l'immunothérapie cancéreuse CAR-T cells(11).....	6
Figure 3. Représentation schématique du mode d'action des vaccins à ARNm anti-COVID-19 (45)	11
Figure 4. Structure schématique de la structure d'un ARN messenger mature (50).....	14
Figure 5. Schéma représentatif de la transcription (51)	16
Figure 6. Illustration schématique de la détection des ARNm étrangers et de l'activation du système immunitaire inné.....	21
Figure 7. Schéma représentatif de la voie RLR-MAVS.....	23
Figure 8. La technologie CleanCap® vs capping enzymatique (70)	29
Figure 9. Processus in vitro de fabrication et de purification des ARNm thérapeutiques	30
Figure 10. Les vaccins anti-COVID-19 à base d'ARNm largement utilisés : Comparaison des différents composants(93)	37
Figure 11. (A) Représentation de l'interaction du SARS-CoV-2 avec le RBD (B) Microscopie électronique cryogénique de la protéine S (94).....	38
Figure 12. Principe du mécanisme d'action des vaccins à base d'ARNm	44
Figure 13. Schéma illustrant la linéarisation d'un ARNm circulaire (108)	48
Figure 14. ARNm conventionnel vs ARNm autoamplifiés(109).....	49
Figure 15. Représentation schématique des vaccins à base de saARNm d'après Machado et al. (105)	51
Figure 16. Fabrication et scale-up des vaccins à ARNm modifiés par des nucléosides(93)....	55
Figure 17. Schéma synthèse des types de vaccins à base d'ARNm et de leur mode d'action dans la COVID-19(93)	56
Figure 18. Optimisation des systèmes de délivrances non-viraux des vaccins à ARNm autoamplifiés(109)	61

1 Introduction

Connus pour être un problème de santé publique et économique, les pandémies sont des épidémies touchant une large zone géographique et une partie importante de la population mondiale. Elles ont marqué l'histoire de l'humanité depuis des siècles. En décembre 2019, une épidémie de pneumonies d'allure virale d'étiologie inconnue a émergé dans la ville de Wuhan (province de Hubei, Chine). Le 9 janvier 2020, la découverte d'un nouveau coronavirus appelé SARS-CoV-2, agent responsable de la nouvelle maladie infectieuse respiratoire, a été annoncée officiellement par les autorités sanitaires chinoise et l'organisation mondiale de la santé (OMS). Afin de répondre efficacement à une demande urgente comme c'est le cas pour la pandémie du SARS-CoV-2, la nécessité de développer des vaccins sûrs, efficaces et de garantir leur accessibilité dans le monde est devenue absolue. En décembre 2020, soit moins d'un an après la découverte de ce virus, alors que, jusqu'à présent, les délais connus pour obtenir un vaccin contre une nouvelle maladie étaient plutôt de dix ans, le monde de la vaccinologie entre dans une nouvelle aire, avec la mise sur le marché du 1er vaccin à ARNm en médecine humaine. L'objectif de cette thèse est de fournir un état de l'art actuel de la technologie des vaccins à base d'ARNm et de proposer des perspectives aux nouveaux défis rencontrés.

Face à l'ampleur chaotique qu'a prise la pandémie de SARS-Cov2 à travers le monde, la pression n'a jamais été aussi forte sur le domaine de la recherche et du développement (R&D), notamment dans le domaine de la vaccinologie. Cette pression a eu pour conséquence l'accélération du processus de mise sur le marché des premiers vaccins à base d'ARNm dans la médecine humaine moins d'1 an après de la découverte et de la publication de la séquence du SARS-CoV-2. En raison de leur sûreté, adaptabilité, facilité et rapidité de production, les vaccins à ARNm étaient les candidats idéals pour répondre à la demande urgente mondiale de vaccins.

Bien que connue depuis des décennies, la technologie à base d'ARNm était limitée en termes de développement. En effet, de nombreux obstacles (par ex. stabilité, immunogénicité) étaient rencontrés. Il a fallu attendre l'apparition de la pandémie du SARS-CoV-2 pour que ces vaccins soient valorisés et mis en avant dans le domaine de la recherche et du développement dans le monde.

Dans le cadre de cette thèse, nous aborderons la molécule d'ARN messenger en y décrivant ses fonctions biologiques et implications thérapeutiques innovantes. Ensuite, un intérêt particulier sera porté sur la structure de l'ARNm mature afin d'en connaître les éléments clés et leur fonction dans le domaine de la vaccinologie. Dans un second temps ; nous décrirons l'évolution de cette nouvelle génération de vaccins et des innovations technologiques qui ont permis leur développement. Puis, nous exposerons leur mécanisme d'action, les défis associés, ainsi que l'amélioration de leur efficacité grâce à l'optimisation. Pour illustrer notre propos, ce travail s'appuiera notamment sur le modèle d'étude du vaccin Cominarty®. Ainsi, nous mettrons en évidence les avantages que présentent ces vaccins par rapport aux vaccins traditionnels et notamment, leurs homologues les vaccins à ADN ; plus particulièrement dans un contexte de la pandémie. Nous finirons cette thèse par une ouverture sur le rôle essentiel joué par les pharmaciens d'officines durant cette crise, ainsi que l'élargissement de leurs compétences dans le domaine de la vaccinologie.

1.1 Fonction biologique de l'ARNm

Walter Gilbert, biochimiste et médecin, pionnier de la biologie moléculaire publie en 1986 « L'hypothèse du monde à acide ribonucléique » postulant qu'au début de l'évolution, les systèmes vivants étaient entièrement composés d'ARN. D'après cette hypothèse, l'ARN est la molécule centrale de toute forme de vie, avant l'émergence de la première cellule à ADN.⁽¹⁾ Chez les eucaryotes, l'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule porteuse de l'information génétique. Celle-ci est principalement présente dans le noyau cellulaire, mais aussi dans les mitochondries et chloroplastes.

L'ARN messenger est une copie transitoire d'un gène correspondant aux instructions d'assemblage d'une protéine. En effet, le patrimoine génétique est essentiellement situé à l'intérieur du noyau de la cellule, sur l'ADN et l'information que renferme l'ADN sert à fabriquer les protéines grâce auxquelles fonctionnent toutes nos cellules. Le rôle de l'ARN messenger est de transmettre l'information hors du noyau, au niveau du cytoplasme, là où les protéines sont fabriquées par les ribosomes. La molécule d'ARNm subit donc une étape de traduction, et son existence permet notamment de réguler l'expression des gènes.

La traduction est initiée après la maturation, qui permet le transport de l'ARNm dans le cytoplasme qui peut enfin être traduite par des ribosomes. Les ARNm eucaryotes sont traduits

par le mécanisme de balayage avec un sens de traduction 5' à 3', dont le codon d'initiation est fréquemment le triplet AUG le plus proche de l'extrémité 5' rencontré en premier par le complexe de pré-initiation 43 S (CPI), contenant un ARN de transfert (ARNt) méthionyl initiateur dans un complexe ternaire avec du guanosine triphosphate (GTP) lié à un facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2).⁽²⁾

La reconnaissance du codon de triplet de nucléotides AUG par l'anticodon de l'ARNt-Met, évoque l'hydrolyse du GTP lié à un facteur d'initiation : l'eIF2, pour produire un CPI 48 S stable. La libération d'eIF2-GDP est suivie de la jonction de la grande sous-unité ribosomique (60S), catalysée par le facteur d'initiation eIF5B, pour produire un complexe d'initiation 80S prêt à commencer la synthèse des protéines. (Figure 1)

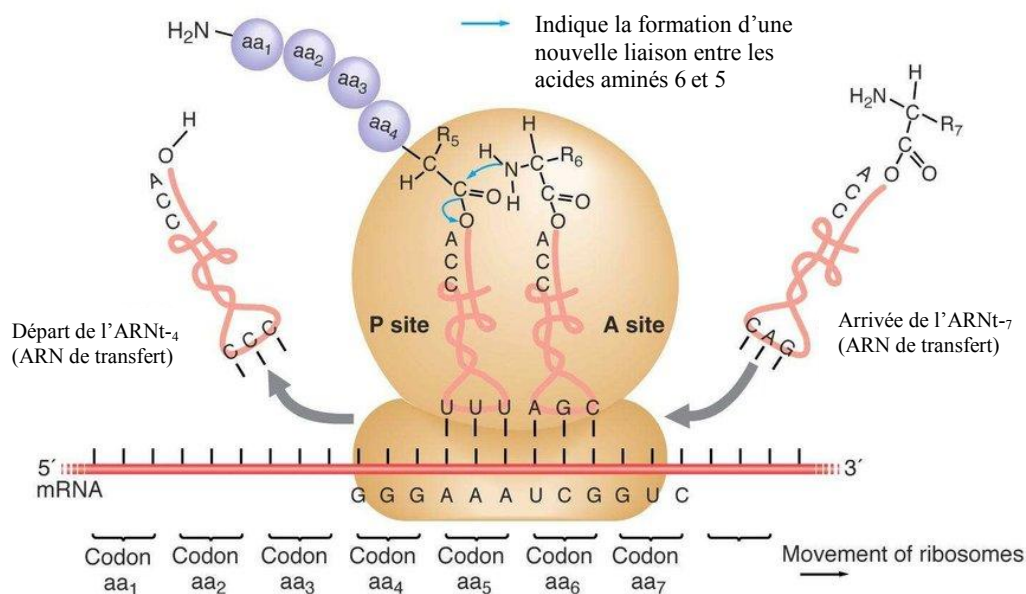


Figure 1. Organisation de la traduction d'un ARNm en protéine (3)

Figure 1 : La traduction de l'ARNm mature se fait dans le cytoplasme cellulaire grâce à différents acteurs parmi lesquels : le ribosome, l'ARN de transfert, les acides aminés, etc.

La principale fonction du ribosome est la protéosynthèse. Celle-ci se déroule en 3 étapes respectivement appelées : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le ribosome possède quatre sites de liaison pour l'ARN : un site de liaison pour l'ARN messager ; un site de liaison de l'amino-acyl-ARNt ou site A, lequel fixe la molécule d'ARN de transfert (ARNt) portant un acide aminé ; un site peptidyl-ARNt ou site P, qui fixe la molécule d'ARNt liée à l'extrémité en croissance de la chaîne peptidique et un site de sortie de l'amino-acyl-ARNt ou site E.

Contrairement à l'ADN qui est conservé tout au long de la vie cellulaire, les ARNm, après un certain temps, se retrouvent dégradés par des ribonucléases (RNases). Leur temps de demi-vie limité permet à la cellule de modifier la synthèse protéique rapidement en fonction de l'évolution de ses besoins. Différents types d'ARNm coexistent au sein d'une même cellule et ont des stabilités différentes. Dans les cellules mammifères, les durées de vie de l'ARNm varient de quelques minutes à plusieurs jours. Plus la stabilité d'un ARNm est grande, plus il y a de protéines produites à partir de ce même ARNm. Certains éléments riches en nucléotide AU permettent une dégradation rapide de l'ARNm. Il s'agit d'un mécanisme essentiel pour prévenir la surproduction de cytokines comme le TNF (*tumor necrosis factor*) et le GM-CSG (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*).⁽⁴⁾ L'appariement de bases avec de petits ARN interférents (siARN) ou microARN (miARN) peuvent également accélérer la dégradation des molécules d'ARNm.⁽⁵⁾ Les ARN interférents sont des ARN simple ou double brin dont l'interférence avec un ARN messager spécifique conduit à sa dégradation

À la fin des années 1960, le concept de thérapie génique est évoqué pour la première fois.⁽⁶⁾ Il s'agit d'une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie. Au début des années 1980, le développement du génie génétique sonne le début de cette révolution médicale. Le génie génétique est l'ensemble des techniques qui permettent d'isoler un fragment d'acide nucléique dans un organisme donné, de le multiplier par clonage et de le réintroduire dans le génome d'un autre organisme.

1.2 ARNm et innovations thérapeutiques

Dans les années 1990, les travaux de recherches sont plutôt axés sur l'ADN et la thérapie génique. Cependant, l'intégration génomique et la tumorigenèse ont été cités comme problèmes de sécurité dans les thérapies géniques à base d'ADN. Les limites associées à l'ARN thérapeutique, telles que leur instabilité (nécessitant un véhicule pour un transport efficace vers les cellules cibles) et leur immunogénicité, les ont rendus moins attractifs que l'ADN en thérapie génique lors du développement initial.⁽⁷⁾ Les thérapies par ARNm peuvent être considérées comme une forme de thérapie génique transitoire sans les complications potentielles de la thérapie génique à long terme, notamment la mutagenèse par insertion, l'immunité vectorielle et les effets de la réplication virale sur la fonction cellulaire.

Ces dernières années, grâce aux avancées technologiques et aux connaissances scientifiques accrues, ces obstacles ont pu être surmontés et permettre l'élaboration de thérapies à base d'ARN dans diverses aires thérapeutiques.

1.2.1 Immunothérapie cancéreuse

La thérapie des cellules *CAR-T* (*Chimeric Antigen Receptor*) a montré de très bons résultats dans plusieurs cancers.⁽⁸⁾ Le traitement par cellules CAR-T est une stratégie d'immunothérapie cellulaire en plein essor, qui vise à combattre le cancer en s'appuyant sur le système immunitaire du patient. Les *CAR-T cells* sont des lymphocytes T, collectés chez le patient cancéreux par leucaphérèse, puis modifiés génétiquement (*ex vivo*) afin qu'elles puissent produire à leur surface des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) capables de reconnaître les cellules tumorales. Les cellules *CAR T* sont alors amplifiées puis administrées au patient et sont capables de tuer les cellules tumorales exprimant l'antigène ciblé. (Figure 2). Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour modifier des cellules T ou NK, y compris l'ARNm.

L'avantage de l'ARNm est sa nature transitoire, pouvant réduire le risque de toxicité par expansion incontrôlée des cellules transférées. Une variété de récepteurs spécifiques d'antigènes ont été délivrés à l'aide d'ARNm et testés pour l'immunité antitumorale dans des modèles animaux.⁽⁹⁾ Un essai clinique de phase I teste l'utilisation de lymphocytes T amplifiés chargés d'ARNm codant pour des CAR dans le cadre du traitement contre le cancer du pancréas.⁽¹⁰⁾

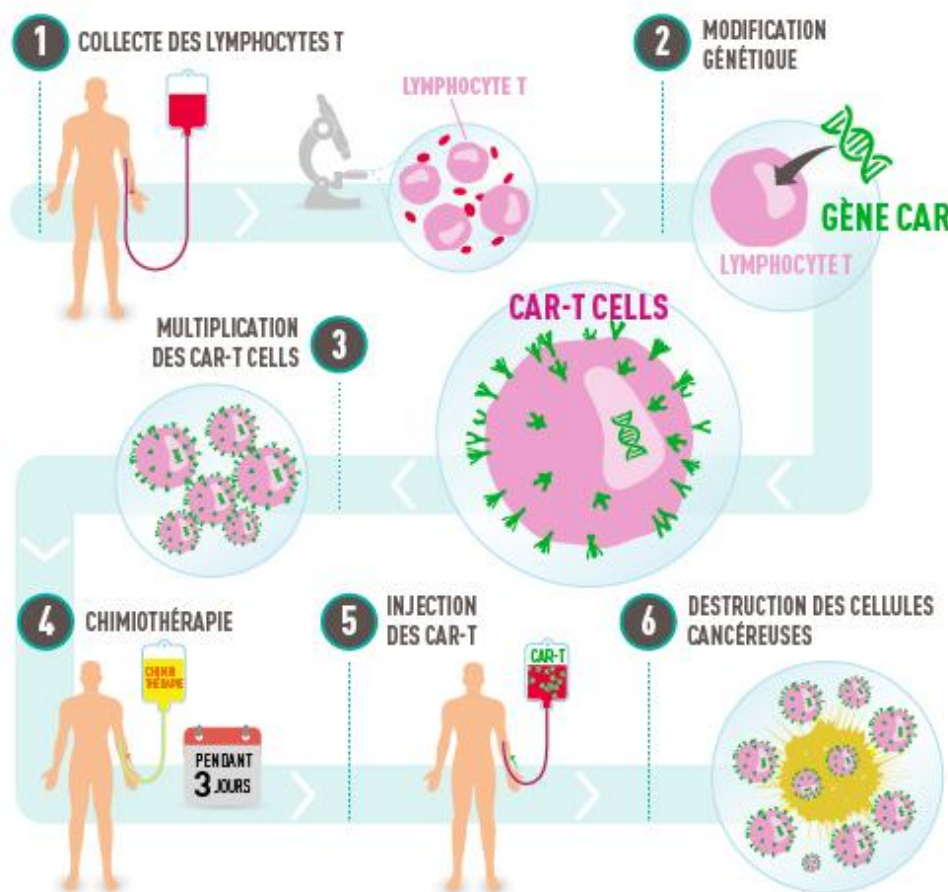


Figure 2. Illustration de l'immunothérapie cancéreuse CAR-T cells(11)

Figure 2 : La production des cellules CAR-T commence par la collecte des lymphocytes T du patient par leucaphérèse. Après un contrôle qualité, ils subissent une modification génétique, on parle de modification *ex vivo* (en dehors de l'organisme). Le principe étant de faire produire par les lymphocytes T, après transduction, des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) à leur surface. Grâce à ce récepteur, les cellules CAR-T sont capables de reconnaître les cellules tumorales et de s'y fixer. La modification génétique permet également d'introduire un élément de « costimulation » qui permet à la cellule CAR-T de s'activer et d'attaquer la cellule cancéreuse une fois fixée sur l'antigène cible. Une fois transformées, les cellules CAR-T sont amplifiées dans le but d'être administrées au patient. Avant l'injection, le patient reçoit durant trois jours une chimiothérapie afin d'affaiblir son système de défense immunitaire. Ainsi, en éliminant une partie des lymphocytes naturels, la multiplication des cellules CAR-T sera favorisée et le risque de rejet sera limité. Une fois dans l'organisme, les cellules CAR-T vont donc reconnaître et cibler les cellules tumorales de manière spécifique grâce au récepteur CAR, puis s'activer et les éliminer.

De nombreuses autres implications thérapeutiques, telles que la reprogrammation cellulaire (iPS, *induced pluripotent stem cells*), la médecine régénérative, l'édition génomique et l'immunothérapie, sont couverts par les thérapies à base d'ARNm en médecine humaine. Néanmoins, l'implication thérapeutique majeure ; qui révolutionna l'aire de la vaccinologie en 2020 lors de la pandémie de la Covid-19 est la vaccination à base d'ARNm. En effet, la vaccination à base d'ARNm est une méthode prometteuse dans la prévention ou le traitement de maladies infectieuses ou cancéreuses notamment.

1.2.2 Vaccinations utilisant l'ARNm

Outre les applications dans le domaine du cancer et des maladies non infectieuses, il est important de mentionner que les vaccins à base d'ARNm ont également un grand potentiel d'application dans le traitement et la prophylaxie des maladies telles que les maladies auto-immunes et allergiques.^(12,13) Ces maladies, bien qu'apparemment diverses, ont pour caractéristique commune une réponse immunitaire indésirable et inappropriée. Par conséquent, contrairement à l'approche utilisée pour les maladies non infectieuses et le cancer, qui repose sur le principe selon lequel l'ARNm et sa formulation stimulent les réponses immunitaires des cellules T et des anticorps⁽¹⁴⁾ dans le cas des maladies non infectieuses, l'objectif est de supprimer une réponse immunitaire.

1.2.2.1 Vaccins à ARNm contre les maladies non infectieuses

Il est important de noter qu'il existe plus de 100 maladies auto-immunes distinctes, et qu'elles sont très complexes, de sorte que pour chacune d'entre elles, il peut y avoir une approche thérapeutique différente.⁽¹⁵⁾ En général, pour les applications relatives aux maladies auto-immunes, un vaccin à base d'ARNm agit en supprimant les réponses immunitaires spécifiques de l'antigène.⁽¹²⁾ Une étude récente réalisée par les chercheurs de BioNTech *RNA Pharmaceuticals*⁽¹²⁾ a décrit les effets de suppression de la maladie d'un vaccin ARNm non inflammatoire dans des modèles de sclérose en plaques chez la souris. Il a été démontré que l'administration de l'antigène cible auto-immun par le candidat vaccin à ARNm dans les cellules présentatrices d'antigènes dans les ganglions lymphatiques a entraîné la prévention des symptômes de la maladie, une réduction de la progression de la maladie et la restauration des fonctions motrices.⁽¹²⁾ Cette étude met l'accent sur le potentiel qu'a la thérapie à base d'ARNm de traiter les maladies auto-immunes en augmentant la tolérance des cellules

immunitaires et en réduisant par conséquent les dommages sans compromettre les fonctions du système immunitaire. Une autre approche importante pour les vaccins à base d'ARNm dans le contexte des maladies auto-immunes repose sur l'utilisation d'ARNm codant pour des cytokines immunomodulatrices. Veiga *et al.*⁽¹⁶⁾ ont démontré l'application d'ARNm codant pour l'IL-10 comme alternative aux thérapies traditionnelles à base de protéines recombinantes dans les maladies inflammatoires de l'intestin. L'expression de l'IL-10 dans les cellules cibles a entraîné une diminution significative des symptômes pathologiques et de la gravité de l'inflammation intestinale.

En ce qui concerne les applications des vaccins à base d'ARNm pour la thérapie des maladies allergiques, contrairement aux applications pour le cancer ou les maladies auto-immunes, la vaccination contre les allergies n'implique pas l'administration d'auto-antigènes.⁽¹⁵⁾ Il est admis que les hypersensibilité de type 1 sont généralement déclenchées par une exposition récurrente à des allergènes qui conduisent à la production d'anticorps IgE spécifiques de l'allergène et à l'activation ultérieure de réponses cellulaires inflammatoires par des complexes immuns (allergène-IgE).⁽¹⁷⁾ Par conséquent, les hypersensibilité de type 1 sont traitées par immunothérapie spécifique aux allergènes car c'est le traitement qui peut modifier la base immunologique des maladies allergiques avec des effets à long terme, et aucune vaccination préventive contre l'allergie de type I n'est disponible^(18,19). Les vaccins à base d'ARNm sont étudiés comme une alternative pour l'immunothérapie spécifique aux allergènes car, grâce à cette technologie, il est possible de délivrer (indirectement) l'allergène sous une forme pure et à des doses plus faibles, diminuant ainsi le risque d'effets secondaires anaphylactiques causés par des IgE préexistantes. En 2009, Roesler *et al.* ont démontré que l'expression vaccinale par ARNm, contre un panel de 29 allergènes, pouvait protéger l'induction d'IgE dans des modèles animaux. Dans cette étude, les avantages de la vaccination par ARNm ont également été observés avec une régulation à la baisse des paramètres inflammatoires pulmonaires.⁽²⁰⁾ De plus, Hattinger *et al.*⁽²¹⁾ ont démontré que la vaccination à base d'ARNm était responsable de la prévention d'une réponse spécifique aux allergènes en inhibant la réponse de type Th2 par la suppression des cytokines Th2 (IL-4 ; IL-13, IL-5), des éosinophiles, de l'expression des IgE, et en favorisant une réponse de type Th1.

Bien que les vaccins à ARNm aient été mis en avant pendant la pandémie de la COVID-19, il est important de noter que de nombreux travaux ont déjà été réalisés en utilisant cette plateforme technologique dans le traitement et la prophylaxie de maladies non

infectieuses. De telles études démontrent le fort potentiel de l'application des vaccins à ARNm.

1.2.2.2 Vaccins à ARNm contre le cancer

Les vaccins anticancéreux à base d'ARNm ont été conçus pour exprimer des antigènes associés à la tumeur, ce qui entraîne le développement de réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T ⁽²²⁾. La leucémie myéloïde aiguë, le cancer du pancréas, le cancer colorectal, les métastases hépatiques, le glioblastome, le cancer de la prostate et le mélanome sont autant d'exemples de pathologies cliniques ciblées par des candidats vaccins anticancéreux à base d'ARNm ⁽²³⁾. L'une des premières études de phase I/II portait sur l'injection directe d'ARNm à des patients atteints de mélanome : si une injection de 200 µg d'ARNm nu s'est avérée sûre, l'efficacité clinique n'a pas été démontrée ⁽²⁴⁾. Peu de temps après, la même équipe a publié un essai de phase I/II d'un vaccin à base d'ARNm protégé par de la protamine chez des patients atteints de mélanome métastatique, démontrant que l'ARNm protégé était non seulement sûr, mais générait une efficacité clinique plus prometteuse ⁽²⁵⁾. Ces résultats montrent une optimisation du système de délivrance, permettant une amélioration d'efficacité du traitement. Ces essais ont permis de remédier à la limite d'efficacité signalée des vaccins à base d'ARNm, qui sont facilement dégradés par les ribonucléases omniprésentes, et ont démontré l'importance du mode d'administration dans les résultats obtenus, ce qui a suscité des recherches sur de nouvelles stratégies d'encapsulation et d'administration, comme l'utilisation de biopolymères, de liposomes ou de cellules dendritiques (CD) ^(14,26). Pour obtenir une réponse immunitaire adaptative améliorée, l'ARNm a été électroporé *ex vivo* dans des cellules dendritiques utilisées pour le transfert adoptif. Cette stratégie a été appliquée dans plusieurs essais cliniques contre le mélanome, le myélome et la leucémie. ⁽²⁷⁾

Avant les études chez l'Homme, des études *in vitro* et *in vivo* utilisant des CD électroporées avec de l'ARNm ont évalué leur capacité à déclencher des réponses immunitaires puissantes contre les antigènes tumoraux. ⁽²⁸⁾ Boczkowski *et al.* ⁽²⁸⁾ ont montré la capacité des vaccins à base de CD stimulés par l'ARN à réduire les métastases pulmonaires chez les rats. Les premiers essais chez l'homme visant à évaluer l'administration d'ARNm ont utilisé des cellules dendritiques dérivées de monocytes transfectées *ex vivo* avec un ARNm codant pour un antigène par électroporation afin de fournir une approche vaccinale à base de

cellules, les cellules étant réinjectées aux patients ⁽²⁹⁾. Depuis lors, de nombreux essais cliniques de phase I/II utilisant cette stratégie d'administration ont été publiés, le cancer de la prostate, le mélanome le cancer du pancréas étant parmi les exemples de cibles thérapeutiques.^(30,31) Cependant, le transfert adoptif étant laborieux, difficile à mettre en place à grande échelle et pouvant induire une immunogénicité défavorable, le domaine a évolué vers le développement de supports d'ARNm plus efficaces et potentiellement moins toxiques en utilisant des lipides ou des matériaux à base de polymères.⁽²⁶⁾

1.2.2.3 Les vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses

Outre l'intérêt pour les vaccins à base d'ARNm dans la lutte contre le cancer, ces dernières années, l'utilisation de ces plates-formes a gagné en importance contre les agents infectieux, en particulier contre les maladies infectieuses émergentes telles que celles causées par le virus Zika, Le virus Ebola et le coronavirus.⁽³²⁾

Les vaccins à base d'ARNm ont encore progressé dans le contexte des infections virales, notamment pour le SRAS-CoV-2 mais aussi pour d'autres virus respiratoires (SRAS-CoV-1)⁽³³⁾, les virus transmis par les insectes (par exemple, Zika⁽³⁴⁾), les virus transmis par les animaux (par ex, rage)⁽³⁵⁾, ainsi que les virus transmis par contact direct avec les humains ou leurs fluides (comme le virus , Ebola ⁽³⁶⁾, le virus de l'herpès, le cytomégalovirus humain)^(37,38) et le VIH ⁽³⁹⁾. Fleeton *et al* ⁽⁴⁰⁾ ont mené une étude pionnière sur les vaccins à ARNm contre les agents infectieux, contre trois virus : le virus de la grippe A, un flavivirus transmis par les tiques (virus de la maladie de loup) et le virus respiratoire syncytial (VRS). Des expériences *in vivo* sur un modèle de souris ont montré que le vaccin à ARNm codant pour les protéines d'enveloppe des trois virus offrait une protection contre chacun des virus évalués ⁽⁴⁰⁾ . Un peu plus de dix ans plus tard, Petsch *et al.* ⁽⁴¹⁾ ont publié d'importantes données précliniques sur des vaccins contre l'infection par le virus de la grippe A basés sur la plateforme RNActive®, démontrant que les vaccins favorisaient une immunité équilibrée, durable et protectrice contre l'infection par le virus de la grippe A chez les petits animaux (souris et furets) et les grands animaux (porcs) ⁽⁴¹⁾. Les vaccins à base d'ARNm peuvent induire une immunité protectrice contre plusieurs virus de la grippe et prolonger les réponses immunitaires^(42,43) ; et les vaccins à base d'ARNm sont maintenant considérés comme des alternatives qui pourraient surmonter les obstacles auxquels se heurte généralement le vaccin antigrippal classique.

Le concept de vaccins à bases d'acides nucléiques (ADN et ARNm) date des années 1990 et a bénéficié de beaucoup de travaux et de progrès. En effet, en 1990, a eu lieu la première utilisation d'ARNm codant pour une protéine potentiellement thérapeutique par Wolff *et al.*⁽⁴⁴⁾. À l'époque, les chercheurs montrent, que la traduction *in vivo* d'un ARNm en protéine est possible après injection intramusculaire de gènes codant pour le chloramphénicol acyl-transférase (CAT), la luciférase et la bêta-galactosidase. La vaccination à base d'acides nucléiques s'est développée au cours des dernières décennies et ces molécules injectées aboutissent toutes les deux à la synthèse de la protéine immunogène. La principale différence entre les vaccins à ADN et à ARNm réside dans le compartiment cellulaire où ces molécules agissent, respectivement dans le noyau et dans le cytoplasme.

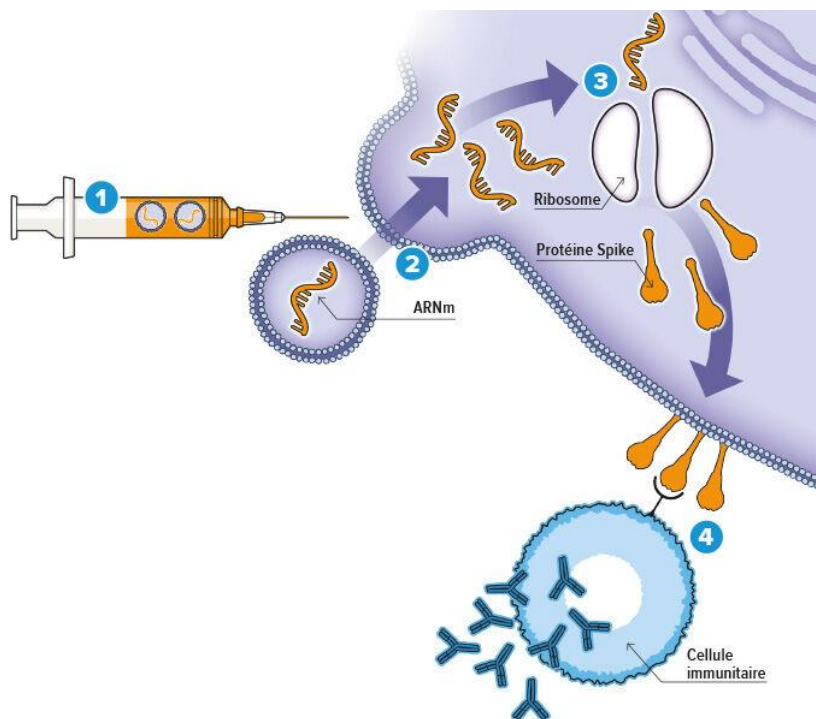


Figure 3. Représentation schématique du mode d'action des vaccins à ARNm anti-COVID-19 (45)

Figure 3: (1) les vaccins sont constitués de fragments d'ARNm enveloppés dans les nanoparticules lipidiques. (2) Après l'injection du vaccin, les nanoparticules lipidiques fusionnent avec la membrane des cellules musculaires (si la voie d'administration est intramusculaire) puis l'ARNm se retrouve dans le cytoplasme (plus précisément dans des vésicules intracellulaires appelées endosomes). (3) Les ribosomes lisent l'ARNm et permettent la protéosynthèse de la protéine d'intérêt (protéine « spike » ou spicule). (4) Réponse immunitaire avec production d'anticorps neutralisants et réponse de type Th1.

Le développement de la biologie moléculaire a permis des progrès médicaux. Dans les années 1990, les premières études montrent que l'ADN était moins onéreux, plus stable et plus facile à synthétiser que l'ARN. Les chercheurs favorisaient donc l'ADN à l'ARNm. Trois ans après la parution de l'article de Wolf *et al.*, toujours sur des modèles animaux, Ulmer *et al.*⁽⁴⁶⁾ ont montré que l'injection d'un plasmide codant la nucléoprotéine du virus de l'influenza A conférait une réponse immunitaire. Ce fut la naissance du principe de la vaccination à ADN avec des premiers résultats prometteurs.

En 2005, la mise sur le marché aux Etats-Unis et au Canada de 3 vaccins à ADN à usage vétérinaire a été possible grâce aux progrès scientifiques et technologiques : West Nile Innovateur® par Pfizer ; Apex-INH® par Novartis Animal Health Inc. et Oncept® par Boehringer Ingelheim Vetmedic. Puis en 2017, un vaccin à ADN contre la maladie pancréatique du saumon a obtenu son AMM en Europe : Clynav® par Elanco Europe. Ces vaccins sont essentiels et ont montré leur efficacité dans le domaine vétérinaire.

Nom du vaccin (laboratoire)	Pathogène ciblé & Espèce vaccinée	Composition / Dose / Nombre d'inoculation	Efficacité vaccinale	Remarques
<i>West Nile</i> <i>Innovateur®</i> Pfizer	Virus de la fièvre du Nil Chevaux	Protéine d'enveloppe E et protéine pré-membrane 1mg/ inoculation	Induction d'anticorps neutralisants Neutralisation de la virémie	Autorisé aux Etats-Unis en 2005 1 ^{er} vaccin à ADN autorisé dans le monde. Remplacé depuis par un autre type de vaccin
<i>Apex-INH®</i> Novartis Animal Health Inc	Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse Saumon	Glycoprotéine G de surface 10µg/ inoculation	Augmentation de la survie (83-98% vs 10-15% pour les témoins)	Autorisé au Canada en 2005
<i>Oncept® Canine Melanome vaccine</i> (Boehringer Ingelheim Vetmedic)	Mélanome oral aux stades II et III Chien	Tyrosinase humaine 500-1000µg/inoculation ; 4 inoculations à 2 semaines d'écart puis 1 tous les 6 mois	Prolongation de l'espérance de vie	Autorisé aux Etats-Unis depuis 2007 Traitement en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie
<i>Clynav®</i> (Elanco Europe)	Maladie pancréatique Saumon	Polyprotéine du virus 6-9,4µg/inoculation	Atténuation des séquelles pancréatiques et de la perte de poids	1 ^{er} vaccin à ADN autorisé dans l'Union Européenne en 2017

Tableau 1. Les 4 vaccins à ADN à usage vétérinaires autorisés (D'après Dory et al. 2021)

Cependant, ce succès n'a pas été reproduit chez l'Homme. Dans un premier temps, cela était dû à une expression insuffisante de l'immunogène codé par l'ADN chez le patient vacciné, qui par la suite fut optimisé grâce à des stratégies d'optimisation du squelette de l'ADN plasmidique ainsi que de nouvelles méthodes d'administration telles que l'électroporation du tissu injecté.⁽⁴⁷⁾ Il est important de noter que l'un des inconvénients principaux des vaccins à base d'ADN est le risque d'intégration génomiques qui peut avoir des conséquences graves telles que l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (même si ce risque est faible, sachant que l'ADN est utilisé à grande échelle chez les animaux, le 20 Août 2021 le gouvernement Indien a autorisé en urgence l'utilisation d'un vaccin à base d'ADN contre le COVID-19, s'agissant du 1^{er} vaccin à ADN mis sur le marché chez l'Homme).

Le 1^{er} vaccin à avoir reçu une AMM contre la COVID-19 est un à vaccin à base d'ARNm. Le principe des vaccins à ARNm présente de nombreux avantages, notamment une sécurité accrue avec un caractère non intégratif comparé à leur homologue ADN. En effet, l'ARNm agissant dans le cytoplasme, la translocation et la transcription nucléaire ne sont pas nécessaires. De plus, le transfert de gène médié par l'ARNm se produit dans les cellules qui se divisent et qui ne se divisent pas, contrairement à celui du gène médié par l'ADN plasmidique.

Le potentiel d'une fabrication rentable et hautement évolutive ainsi que l'induction de réponses immunitaires protectrices suffisantes à petites doses ont été observées.⁽⁴⁸⁾

Bien qu'il existe de nombreux avantages, de nombreux défis (stabilité, vectorisation, durée d'action au long terme) persistaient et ont pu être surmontés après de nombreuses années de recherches et de progrès technologiques, ce qui a permis la mise sur le marché du 1^{er} vaccin à ARNm le 21 décembre 2020, soit moins d'un an après la découverte du coronavirus à l'origine de la pandémie la plus importante du XXI^{ème} siècle. Les vaccins à base d'ARNm permettent la conception bien contrôlée de séquences de transcription à demande et pourraient être adaptés à toute crise pandémique. Cette technologie polyvalente peut obtenir de fortes réponses immunitaires humorales et cellulaires, possède de nombreux auto-adjuvants et conduit à une traduction transitoire indépendante du cycle cellulaire et donc une exposition à l'antigène plus contrôlée ce qui minimise le risque d'induction de tolérances à ces vaccins.

1.3 La molécule d'ARN messenger : origine et structure

On rencontre plusieurs familles d'ARN dans les cellules, dont les principales sont : les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), et les ARN messagers (ARNm). Les ARN ribosomiques constituent les ribosomes, organites cellulaires impliqués dans la traduction des protéines. Ils représentent environ 80% des ARN cellulaires totaux. Les ARNt sont les transporteurs d'acides aminés. Il existe environ 70 ARNt différents pour 20 acides aminés différents et ils représentent 15% de l'ARN cellulaire total. Et enfin, les ARNm qui sont porteurs du message permettant la synthèse des protéines. Ils correspondent à un faible pourcentage des ARN cellulaire (entre 2 et 4%). Ce sont ces derniers qui vont nous intéresser dans le cadre des vaccins à base d'ARNm. Ils sont de taille variable et ont une durée de vie courte (quelques minutes à 24h).

La molécule d'ARNm est composée d'environ 300 à 500,000 nucléotides. Structuellement l'ARNm contient du ribose et des bases nucléotidiques (Adénine, Uracile, Cytosine et Guanine). La molécule d'ARN se distingue de la molécule d'ADN par sa composition en sucre et en bases nucléotidiques. Elle est organisée en 5 régions : une coiffe 5', une région 5' non codante (5'-UTR), un cadre ouvert de lecture (région codante traduite en protéine), une région 3' non codante et une queue polyadénylée à l'extrémité 3'.⁽⁴⁹⁾ (

Figure 4)

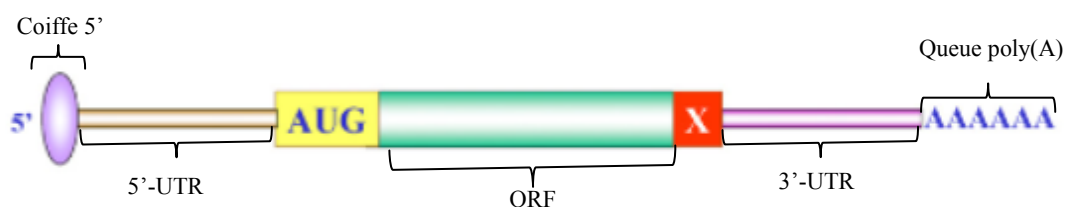


Figure 4. Structure schématique de la structure d'un ARN messenger mature (50)

Figure 4: L'ARNm est constitué de 5' vers 3' d'une coiffe 7-méthylguanosine (m^7G), indispensable à la stabilité de la molécule d'ARNm et à son exportation du noyau vers le cytoplasme d'une région 5' non codante (5'UTR), d'un cadre ouvert de lecture (open reading frame [ORF]) : région codante traduite en protéine, d'une région 3' non codante (3' UTR) et d'une queue polyadénylée (poly[A]) dont le rôle est de faciliter l'exportation du noyau, stabiliser l'ARNm et en promouvoir la traduction. Deux codons spécifiques limitent l'ORF : le codon initiateur AUG et le codon stop (X sur la Figure 4). Le codon stop correspond à un des codons suivants : UAA, UGA et UAG.

La transcription permet la synthèse d'une molécule d'ARN messager (ARNm) à partir de la séquence d'ADN d'un gène. Il s'agit d'un processus qui a lieu dans le noyau de la cellule (*Figure 5*). La transcription des gènes se déroule en deux étapes :

1.3.1 La formation d'ARN pré-messager

Tout l'ADN n'est pas transcrit en ARN, seules les régions correspondant à des gènes le sont (l'expression de ces gènes pouvant être régulée en fonction du type cellulaire, du stade de développement, etc). Tout d'abord, l'initiation de la transcription grâce à différents acteurs :

Le promoteur correspond à une région non transcrite de l'ADN, sa séquence permet de recruter l'ARN polymérase II. L'ARN polymérase est l'enzyme qui synthétise l'ARN pré messager en assemblant des ribonucléotides libres par complémentarité des bases du brin transcrit. Certaines séquences du promoteur sont importantes car elles sont reconnues spécifiquement par différentes protéines appartenant au complexe d'initiation (par exemple : la « TATA box » riche en thymine et adénine, elle est située vers -25 à -30 nucléotides du site de démarrage de la transcription. Ces séquences sont souvent bien conservées). Le complexe d'initiation composé de l'ARNpol II et des différents facteurs de transcriptions (TFII) ce qui est suffisant pour obtenir une activité transcriptionnelle in vitro mais à très faible taux.

Des protéines activatrices ou inhibitrices se lient à des promoteurs distaux spécifiques de l'ADN, appelées « enhancers » lorsqu'ils recrutent des cofacteurs activateurs ou « *silencers* » lorsqu'ils recrutent des cofacteurs inhibiteurs. Malgré la distance entre les promoteurs proximaux, grâce à la courbure de l'ADN, ces derniers interagissent sur le promoteur proximal. Puis l'étape d'élongation :

L'ARNpol II est équipée de facteurs protéiques d'élongation qui facilitent sa progression au travers d'une chromatine dont ils relâchent la structure. Un brin antisens, complémentaire du brin codant (brin sens) est néosynthétisé et identique au brin codant d'ADN, aux uraciles et riboses près. Enfin, l'ARNpol II est équipée de facteurs protéiques de terminaison. Elle reconnaît ainsi un ou plusieurs signaux de terminaison annonçant la fin de la transcription sur le brin d'ADN matrice.



Figure 5 : La transcription est la première étape de l'expression génique. La molécule d'ADN est la matrice utilisée lors de l'étape de transcription. Cette étape consiste à créer une copie d'un segment d'ADN en ARN ; Pendant la transcription, l'hélicase sépare les deux brins d'ADN pour faciliter l'action de l'ARN polymérase qui reconnaît une région particulière de l'ADN : le site promoteur (qui se situe sur le brin anti-sens), et commence son action de copie de la séquence du brin complémentaire et antiparallèle. Cette étape se produit dans le noyau et c'est l'ARN polymérase II qui est à l'origine de la transcription de l'ARNm. (La processivité de ces enzymes varie aux alentours de 30 à 60 nucléotides incorporés par seconde). L'ARN pré-messager est composé de deux types de segments : les exons et les introns. Les exons seront conservés dans l'ARNm mature et les introns seront excisés lors de l'étape d'épissage. Les extrémités 5' et 3' ne sont pas modifiées, ce qui rend ces molécules plus fragiles avec une faible demi-vie.

L'ARN pré-messager aussi appelé transcrit primaire, doit subir des modifications avant d'être traduit en protéine. Ces modifications consistent notamment à augmenter sa demi-vie et modifier sa séquence. Il existe trois grands types de modifications, catalysées par des enzymes de nature protéique ou ribonucléique.

- L'addition d'une coiffe en 5'

Celle-ci consiste en l'ajout d'un nucléotide à guanine sur l'extrémité 5' de l'ARN suivi d'une méthylation sur l'azote en position 7, ainsi qu'une méthylation en 2' du ribose du premier ou des deux premiers nucléotides du transcrit primaire : 7-Méthylguanosine (m^7G). La liaison mise en jeu dans cet ajout rend cette coiffe indispensable pour la stabilité de l'ARNm, qui en résulte protéger contre la dégradation. En effet, il s'agit d'une liaison anhydride d'acide entre les acides phosphoriques des deux nucléotides. L'extrémité 5' n'est plus porteuse des 3 acides phosphoriques libres habituels mais porteuse d'un GMP, ce qui limite la réactivité de cette extrémité et sa reconnaissance par les exonucléases. Cette coiffe en 5' permet également l'exportation de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme ainsi qu'à la liaison avec la petite sous-unité du ribosome, lors de l'étape d'initiation de la traduction.

- L'excision & l'épissage

Chez les eucaryotes, les gènes sont constitués d'une alternance d'exons (régions codantes du gène) et d'introns (régions non codantes, bornées par des séquences de bases spécifiques : 5'GU et 3'AG), ils sont d'abord intégralement copiés dans le transcrit primaire, puis subissent une étape d'excision des introns suivie d'un épissage (ou *splicing*) des exons qui constituent l'ARNm. En plus de l'épissage constitutif, il existe également des épissages alternatifs, ce mécanisme décuple les capacités codantes d'un gène. L'excision d'introns lors de l'épissage d'épissage permet d'aboutir à un ARNm mature réduit et traduisible en protéine.

- L'addition d'une queue polyA en 3'

La polyadénylation est un processus initié par différents acteurs qui interagissent entre eux pour former le complexe de clivage qui va cliver la molécule d'ARN pré-messager au niveau du site de clivage (CA entouré par une séquence AAUAAA très conservée et une séquence DSE (*DownStream Element*) riche en U ou en GU). La PAP (PolyA polymérase) va ajouter environ 200 nucléotides, la *polyA binding protein II* (PABP2) et la PAP contrôlent la longueur de la queue polyA. Cette queue polyA n'est pas codée puisque la polymérase n'utilise pas de matrice ADN. L'addition d'une queue polyA à l'ARNm confère une stabilité accrue au préARN, et se perd au fur et à mesure de sa traduction en protéine. Les rôles d'une queue poly(A) sont de faciliter l'exportation du noyau, promouvoir la traduction et d'empêcher la destruction de la molécule d'ARN.⁽⁴⁹⁾

2 Regain d'intérêt des vaccins à ARNm

Malgré les succès des vaccins à ADN, le développement de vaccins à ARNm ont été retardé en raison de plusieurs contraintes associées à la stabilité de l'ARNm, la nécessité de délivrer efficacement les ARNm dans les cellules, mais aussi par leur capacité à être reconnus et activer certains acteurs du système immunitaire

2.1 Les mécanismes de reconnaissances des ARNm par le système immunitaire

Chez les vertébrés, deux systèmes complémentaires ont évolué pour détecter et lutter contre les pathogènes microbiens : les systèmes immunitaires inné et adaptatif. En tant que première ligne de défense de l'hôte, le système immunitaire inné déploie un nombre limité de récepteurs appelés récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (*pattern recognition receptor* [PRR]) pour détecter et répondre à la présence d'agents pathogènes. Les PRR reconnaissent les structures moléculaires conservées connues sous le nom de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) qui sont essentielles dans le cycle de vie de l'agent pathogène. De nombreux PAMP, tels que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes et la flagelline, se trouvent dans les agents pathogènes mais pas chez l'hôte, ce qui permet à l'hôte de distinguer le non-soi du soi grâce aux PRR. Une exception apparente est la détection d'acides nucléiques dérivés d'agents pathogènes. Le fait que les acides nucléiques puissent servir de PAMP élargit considérablement le répertoire de micro-organismes détectables par le système immunitaire de l'hôte. En principe, tous les organismes étrangers utilisent l'ADN et/ou l'ARN comme supports d'informations génétiques dans leur cycle de vie et pourraient donc potentiellement activer les capteurs d'acide nucléique de l'hôte. Cependant, cela introduit également le risque d'auto-reconnaissance des acides nucléiques par les récepteurs de l'immunité innée.⁽⁵²⁾

2.1.1 La réponse interféron

Les acides nucléiques étrangers peuvent être reconnus par différentes familles de récepteurs du système immunitaire inné, aboutissant à la production d'interférons. Les interférons sont des glycoprotéines de la famille des cytokines (molécules de signalisation contrôlant le système immunitaire) produites suites à une infection virale. En se fixant sur leur cible ces cytokines déclenchent chez celles-ci un état de résistance aux virus. Ce facteur fut nommé interféron, car il permet l'interférence virale en permettant l'acquisition de la résistance cellulaire face à un virus. Parmi les interférons, on retrouve 3 types : les types I et III sont impliqués dans l'immunité innée antivirale, tandis que le type II intervient comme

molécule de communication entre les cellules immunitaires. Les Interférons de type I (IFN-I) sont des cytokines très puissantes initialement identifiées pour leur rôle essentiel dans la défense antivirale.⁽⁵³⁾ Ces cytokines façonnent les réponses immunitaires innées et adaptatives. Elles sont rapidement sécrétées après induction par plusieurs voies de signalisation immunitaire innées, puis signalent de manière autocrine et paracrine en se liant aux récepteurs IFNAR (*IFN α/β receptors*), ce qui déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'expression d'une centaine de gènes (*interferon-stimulated genes*, ISG), dont certains codent pour des facteurs de restriction virale.

Le gène codant cette cytokine est activé dans toutes les cellules infectées, mais il s'active aussi chez les cellules voisines par communication paracrine des cellules infectées avec les cellules voisines. La cellule infectée meurt, tuée par le virus, par cytolysse virale. Celle-ci libère des milliers de copies virales qui vont infecter les cellules voisines. Néanmoins, ces cellules, en réaction à l'interféron, auront déjà commencé à produire une grande quantité de protéines kinases R (ou PKR). Lorsqu'un virus infecte ces cellules « mises en garde », la PKR s'active après reconnaissance d'ARN double brin viral. Une fois la PKR activée, elle va aboutir à la phosphorylation du facteur d'initiation eucaryote (eIF-2), limitant la capacité de traduction de l'ARN et donc de protéines codées par l'ARN, ce qui empêche la réplication virale et inhibe la fonction des ribosomes, tuant les virus. (

Figure 6)

L'un des principaux obstacles au développement des vaccins à ARNm concerne la stimulation du système immunitaire inné déclenchant le mécanisme de défense antivirale cellulaire via l'interféron de type I entraîne la dégradation du vaccin à ARNm empêchant sa traduction en protéine. Ce caractère d'adjuvant intrinsèque peut être bénéfique s'il est contrôlé, car la plupart des vaccins traditionnels constitués d'antigènes protéiques recombinants ne parviennent pas à activer les récepteurs PRR, et nécessitent donc l'ajout d'adjuvants pour évoquer des réponses effectrices.⁽⁵⁴⁾

L'ARNm suscite des réponses immunitaires innées de façon comparable à une infection bactérienne ou virale.⁽⁵⁵⁾ Ces récepteurs sont majoritairement exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Lors de la détection de l'ARNm étranger, les PRR peuvent entraîner l'activation de la voie IFN de type I caractérisée par une régulation à la hausse d'une centaine de gènes, y compris ceux codant pour les cytokines pro-inflammatoires,

la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR) et les récepteurs de l'oligoaldénylate synthase (OAS), mais également l'inhibition de la traduction et la dégradation de l'ARN. La production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines conduisent à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. L'activation de ces molécules facilite en outre la maturation des CPA et stimule la sécrétion de cytokines inflammatoires, et elle peut améliorer la fonction des lymphocytes adaptatifs, améliorant l'efficacité du vaccin. Cependant, une activation immunitaire non contrôlée peut induire la dégradation de l'ARNm et réduire l'expression de l'antigène.

Pour contourner ce problème et optimiser l'efficacité des vaccins à ARNm, il a d'abord fallu comprendre le mécanisme de reconnaissance des acides ribonucléiques étranger ainsi que les voies cellulaires induites. Il existe deux principales classes de PRR : extracellulaire et intracellulaire, permettant de reconnaître les PAMP en tant que molécules circulant dans le compartiment extracellulaire, ou une fois internalisées. À l'intérieur de la cellule, c'est au niveau de l'endosome que la molécule d'ARNm étrangère est reconnue par les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR).

Le récepteur TLR-3 reconnaît l'ARN double brin (ARNdb), puis recrute la protéine adaptatrice contenant des domaines TIR (TRIF), qui initie des voies de transduction de signal, aboutissant à l'expression d'IFN de type I.

L'ARN simple brin (ARNsb) est reconnu par TLR-7 et TLR-8, qui recrutent MyD88 (*Myeloid Differentiation marker 88*), et comme pour TLR-3, conduit à la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires. (

Figure 6)

Dans le cytosol, on retrouve d'autres familles de récepteurs intracellulaires qui détectent les acides ribonucléiques étrangers. Parmi eux, les récepteurs de type RIG-I (ou RLR de l'anglais *RIG-I like receptor*) ; les récepteurs des NOD (de l'anglais *nucleotide oligomerization domain receptors*), les récepteurs de l'OAS (oligoaldénylate synthase) et la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR). (

Figure 6)

La sérine-thréonine kinase PKR est un récepteur d'ARNdb et peut être régulée positivement par l'IFN de type I et est activé lors de la liaison avec un ARNdb. Une fois activé, PKR phosphoryle le facteur d'initiation eucaryote eIF-2 (*cf 1.1*), ce qui a pour conséquence d'inhiber la traduction. La dégradation de l'ARN étranger est induite à la suite de la liaison de l'ARNdb à l'OAS par activation d'une RNase L.⁽⁵⁶⁾

Les effets négatifs de l'activation du senseur d'ARNm (réponse IFN) ont été mis en évidence pour la vaccination à base d'ARNm où l'ARNm codait pour l'antigène Gag VIH-1. Les chercheurs ont démontré que l'IFN de type I inhibait l'expression de l'ARNm et l'induction subséquente de réponses immunitaires spécifiques à l'antigène.⁽⁵⁷⁾

2.1.2 La voie RLR-MAVS

Les Récepteurs de type RIG-I (ou RLR de l'anglais *RIG-I like receptor*) sont des senseurs d'ARN localisés dans le cytosol. Ils induisent des réponses d'IFN de type I lors de la reconnaissance de molécules d'ARN étrangers (ex : virus à ARN). Comme mentionné ci-dessus, il s'agit d'une famille comprenant 3 membres : RIG-I, MDA5 et LGP2. Ils possèdent tous un domaine hélicase central et un domaine carboxy-terminal responsables de la détection des ARN étrangers. RIG-I et MDA5 ont des domaines d'activation et de recrutent de caspases amino-terminales (DARC) intervenant dans la transduction du signal en aval. Les récepteurs LGP2 ne possèdent pas ces domaines DARC mais régulent RIG-I et MDA5.

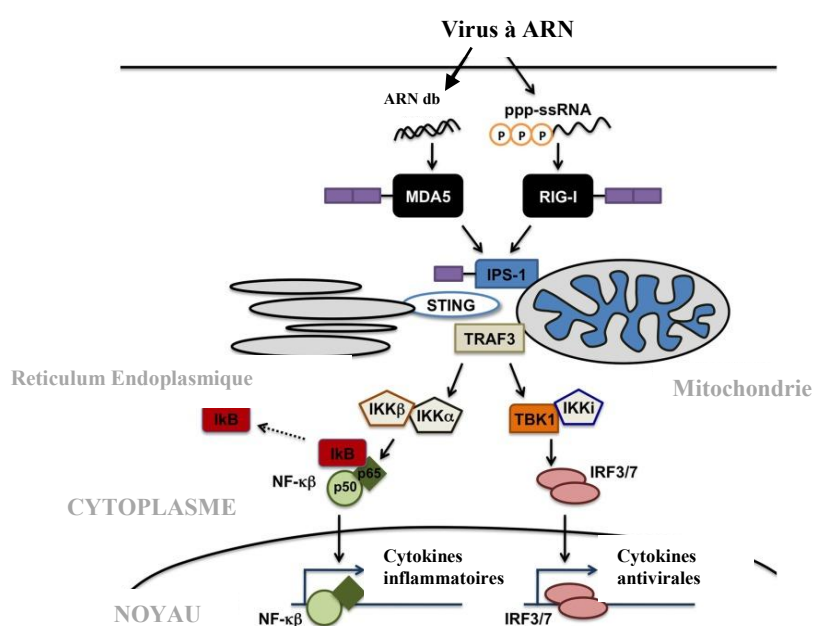


Figure 7. Schéma représentatif de la voie RLR-MAVS

Figure 7 : Les récepteurs de type RIG-I (Retinoic acid inducible gene) servent de capteurs cytosoliques pour les motifs d'ARN viraux et peuvent déclencher des réponses cellulaires antivirales et inflammatoires. Le récepteur MDA5 reconnaît les motifs d'ARN double brin (ARNdb), tandis que le RIG-I perçoit de courts ARN simple ou double brin avec des extrémités 5' triphosphate (ARNsb). L'interaction de l'hélicase avec ces ARN viraux induit le recrutement de molécules effectrices en aval, notamment le stimulateur du promoteur de l'interféron (IPS)-1 associé aux mitochondries ou aux peroxysomes, le facteur associé au récepteur du TNF (TRAF) 3, et/ou le stimulateur des gènes de l'interféron (STING), ce qui entraîne l'activation des kinases apparentées à l' $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase (IKK), de la kinase 1 (TBK1) associée à l'activateur du $\text{NF-}\kappa\text{B}$, membre de la famille TRAF, et de l'IKK-I. Ces kinases activent les facteurs de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) 3, qui se transloquent dans le noyau et activent la transcription de cytokines antivirales et inflammatoires.

La signalisation en aval de RIG-I et MDA5 dépend de la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (*mitochondrial antiviral signaling*, MAVS). Comme son nom l'indique MAVS est localisée au niveau de la membrane mitochondriale, dans le compartiment externe. Elle comprend un domaine DARC, suivi d'un domaine riche en proline et d'un court domaine transmembranaire à son extrémité C-ter qui la localise à la membrane externe mitochondriale. C'est l'interaction des domaines DARC de MAVS et de RIG-I et MDA5 qui permet la signalisation. Par ailleurs, une étude sur des souris transgéniques MAVS^{-/-} (pour lesquels les gènes MAVS ont été invalidés) a démontré que la voie de signalisation MAVS est essentielle pour la défense immunitaire antivirale *in vivo*.⁽⁵⁸⁾

Par conséquent, la conception de la séquence d'ARNm est une étape critique et cruciale devant être réalisée de façon à activer le système immunitaire inné pour initier la réponse immunitaire adaptative, tout en évitant une stimulation inhibitrice de la traduction de l'ARNm et des réponses immunitaires engendrées.

Des capteurs de détection des molécules d'ADN existent également, on retrouve notamment la voie cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase-stimulator if interferon genes*), DHX (*DEAH box nucleic acid helicase*), AIM2 (*absent in melanoma 2*). Ces capteurs détectent les molécules d'ADN étrangères localisées en dehors du noyau cellulaire.

2.2 Les innovations qui ont permis le développement des vaccins à ARNm

2.2.1 Le procédé de production *in vitro* et les éléments clés de l'ARNm

Afin d'obtenir une réponse immunitaire équilibrée, sans engendrer une destruction des vaccins à ARNm, une première innovation permettant leur développement a été d'adapter et d'optimiser leurs séquences. L'utilisation clinique des thérapies à base d'ARNm a été rendu possible grâce aux progrès réalisés dans la conception des procédés de fabrication et d'administration intracellulaire.

Les molécules d'ARNm thérapeutiques sont fabriquées par le processus de transcription *in vitro*. Celui-ci consiste à produire plusieurs copies d'ARNm conçues pour ressembler à des molécules d'ARNm matures, telles qu'elles se trouveraient dans le cytoplasme de cellules de mammifères. On part d'une matrice d'ADN synthétisé plasmidique linéarisé contenant un promoteur reconnu par une ARN polymérase de bactériophage tel que T7, T3 ou SP6. La première étape consiste à sélectionner la séquence d'ADN qui codera l'antigène du vaccin à base d'ARNm. La matrice d'ADN doit être produite en quantité suffisante, soit par clonage dans un plasmide soit par réaction d'amplification génique PCR (*polymerase chain reaction*). Généralement, ce plasmide est produit et amplifié dans une bactérie (*E. Coli*). Pour que la transcription s'effectue, le milieu doit disposer d'ADN plasmidique linéarisé, d'ARN polymérases ADN dépendant, de nucléosides triphosphates et d'ions Magnésium. Après la transcription, la matrice d'ADN est digérée par des DNases, et l'ARNm vaccinal synthétisé et prêt aux procédés de purification pour améliorer sa capacité de traduction. L'ARNm vaccinal est purifié par des procédés d'isolement d'acides nucléiques. La purification par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) prévient la reconnaissance et la dégradation de l'ARNm étranger par le système immunitaire. Cela aboutit à l'amélioration de la capacité de traduction de l'ARNm codant pour la protéine thérapeutique.⁽⁵⁹⁾ Des modifications post-transcriptionnelles supplémentaires peuvent être ajoutées pour assurer le succès des vaccins à ARNm. (

Figure 9)

L'activation du système immunitaire par les ARNm étrangers a longtemps compromis l'efficacité et le développement des thérapies à base d'ARNm. Celle-ci dépend de la présence d'éléments clés tels que : la coiffe en 5', la région 5' UTR, le cadre ouvert de lecture, (ou ORF de l'anglais *Open Reading Frame*) séquence codant le gène d'intérêt, la région 3' UTR, la queue poly(A) en 3'. Sans ces éléments clés mimant les molécules d'ARNm endogènes, ainsi que leur optimisation, ces ARNm vaccinaux risquent d'être dégradés ; soit par des exonucléases soit via les mécanismes vus précédemment (ex. réponse de type IFN) et leur efficacité traductionnelle risque d'être limitée.

2.2.1.1 Les modifications structurales de l'ARNm vaccinal

Une des caractéristiques des ARNm eucaryotes est la coiffe en 5' (aussi appelée CAP en anglais), celle-ci consiste en l'ajout de N7-méthylguanosine au premier nucléotide de l'ARNm. Comme vu précédemment (*cf* 1.3.2), cette coiffe joue un rôle dans l'épissage pré-ARNm, la polyadénylation, l'exportation nucléaire et dans la protection contre les exonucléases. Cependant, elle joue également un rôle essentiel dans les vaccins à ARNm : la coiffe en 5' peut présenter différentes conformations. C'est la structure CAP-1, naturelle qui est requise afin que la molécule exogène soit reconnue comme molécule du soi. En effet, une molécule d'ARNm avec une coiffe de structure CAP-0 ou l'absence de coiffe en 5' (5' triphosphate ou 5' diphosphate) enclenche une reconnaissance par les récepteurs de type PRR tels que RIG-I ou IFIT (*IFN induced tetratricopeptide repeat*), à l'origine d'une réponse IFN de type I aboutissant à leur destruction.^(60,61)

Les régions UTR sont des régulateurs de la dégradation des vaccins à ARNm. Historiquement, l'utilisation d'UTR d'alpha-globine ou beta-globine de grenouilles ou humaines était favorisée dans la vaccination à base d'ARNm en raison de leur grande stabilité. Cependant, les performances des UTR dépendant de l'espèce, des types cellulaires et de l'état cellulaire, chaque stratégie vaccinale doit définir quelles séquences UTR sont les plus pertinentes. Il a été démontré que les 5'UTR trouvés dans de nombreux ARNm d'orthopoxvirus inhibent à la fois l'élimination de la coiffe et la dégradation par les exonucléases 3'-5'.⁽⁶²⁾ Les séquences 3' UTR sont plus particulièrement impliquées dans la stabilité des molécules d'ARNm. Récemment, une méthode a été développée pour identifier les séquences 3'UTR stabilisatrices de l'ARNm en utilisant l'enrichissement progressif d'ARNm synthétique à demi-vie plus longue, via plusieurs cycles de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*).⁽⁶³⁾

La longueur accrue des queues poly(A) n'est généralement pas associée à une meilleure efficacité de la traduction ou de la stabilité dans les cellules non embryonnaires. Des queues poly(A) relativement courtes et définies dans des molécules d'ARNm ont même montré de meilleurs profils d'expressions du gène.⁽⁶⁴⁾ En effet, selon le modèle d'élagage (ou de raccourcissement), la protéine de liaison poly(A) proximale (PABP) qui se lie à la région 3'UTR dans les ARNm stables se retrouve étroitement associée à la coiffe 5' via des facteurs d'initiation de la traduction, ce qui favorise une structure dite « en boucle fermée », aboutissant à des interactions protéine-protéine et protéine-ARN. Cette structure empêche la déadénylation du transcrit et donc sa dégradation exonucléotidique.⁽⁶⁴⁾ Cependant, d'après des études antérieures, de longues queues poly(A) (mesurant 120 nucléotides) par rapport à des queues plus courtes, améliorerait la stabilité de l'ARNm ainsi que son efficacité traductionnelle.⁽⁶⁵⁾

Ces résultats contradictoires peuvent être expliquées par le fait que des ARNm vaccinaux avec des queues poly(A) longues et/ou moyennes peuvent initialement recruter des PABP et être raccourcis à une queue d'une longueur minimum de 30 nucléotides (pour maintenir leur stabilité).⁽⁶⁴⁾ Ainsi, de plus amples recherches portant sur le rôle de la taille des queues poly(A) dans l'évolution de l'expression de l'antigène par l'ARNm vaccinal devant être obtenue une fois que la cellule présentatrice d'antigène migre vers le ganglion lymphatique devraient être réalisées.

Le cadre ouvert de lecture (ORF) est un élément essentiel qui joue un rôle dans l'efficacité de la traduction et dans la forte réponse immunitaire innée due à la reconnaissance des PRR. Une équipe qui travaille sur le système Cas9 / ARN guide (Cas9/gARN) a suggéré qu'un appauvrissement en uridines remplacés par des nucléotides d'uridines modifiés (5-méthoxyuridine ou pseudo-uridine) ont permis une large utilisation de Cas9. Ce phénomène est dû à une reconnaissance des régions riches en uridines par RIG-I⁽⁶⁶⁾ La déplétion en uridines montre une amélioration de l'expression des protéines dans les thérapies à bases d'ARNm.

2.2.1.2 Les étapes et stratégies de production des vaccins à ARNm

Lors de la 1^{ère} étape de production d'ARNm en vaccinologie, les ARN polymérases de phage produisent des ARNdb indésirables qui peuvent être reconnues par MDA-5 et activer la réponse immunitaire innée, empêchant la traduction de l'ARNm. Il s'agit du contaminant majeur des ARNm. Ainsi, il est important de diminuer l'apparition de ces ARNdb. Celles-ci peuvent être réduites en abaissant la concentration de magnésium (Mg^{2+}) lors du processus de production⁽⁶⁷⁾. D'autres options, telles que l'utilisation de nucléosides modifiés⁽⁶⁸⁾ ou d'une ARN polymérase T7 thermostable produisant de l'ARNm à 50°C ou lors d'étapes de purifications (ex : HPLC). (

Figure 9)

Les nucléotides modifiés sont au centre de plusieurs études récentes et montrent des résultats prometteurs quant à leur capacité à augmenter la puissance des vaccins à base d'ARNm (*Cf* 3.3). Nous avons vu qu'ils pouvaient diminuer la quantité d'ARNdb générées lors de la production. Ils sont également à l'origine de la capacité de l'ARNm vaccinal à éviter la reconnaissance et l'activation des PRR.⁽⁶⁹⁾

Des études suggèrent que les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm pourraient être un outil puissant pour échapper aux réponses du système immunitaire inné. Les modifications post-transcriptionnelles comprennent le coiffage (coiffe en 5') et la déphosphorylation en 5'. Deux stratégies sont utilisées :

1. L'utilisation d'analogues de la coiffe tel que ARCA (anti-reverse-Cap-analog) ou Clean Cap dans une réaction en 1 étape.⁽⁵⁵⁾
2. L'utilisation d'une réaction enzymatique à la suite du processus de production-d'ARNm thérapeutique.⁽⁵⁵⁾

La 1^{ère} stratégie présente comme avantages d'être plus simple, plus rapide et plus facile à contrôler par rapport aux réactions enzymatiques qui nécessitent une étape supplémentaire. Pour optimiser la traduction de l'ARNm, les ARNm vaccinaux non coiffés doivent être déphosphorylés à l'aide de phosphatases pour éviter une reconnaissance par le système

immunitaire inné via RIG-I qui reconnaît les 5'-triphosphates⁽⁶⁰⁾ et qui pourrait inhiber leur traduction.

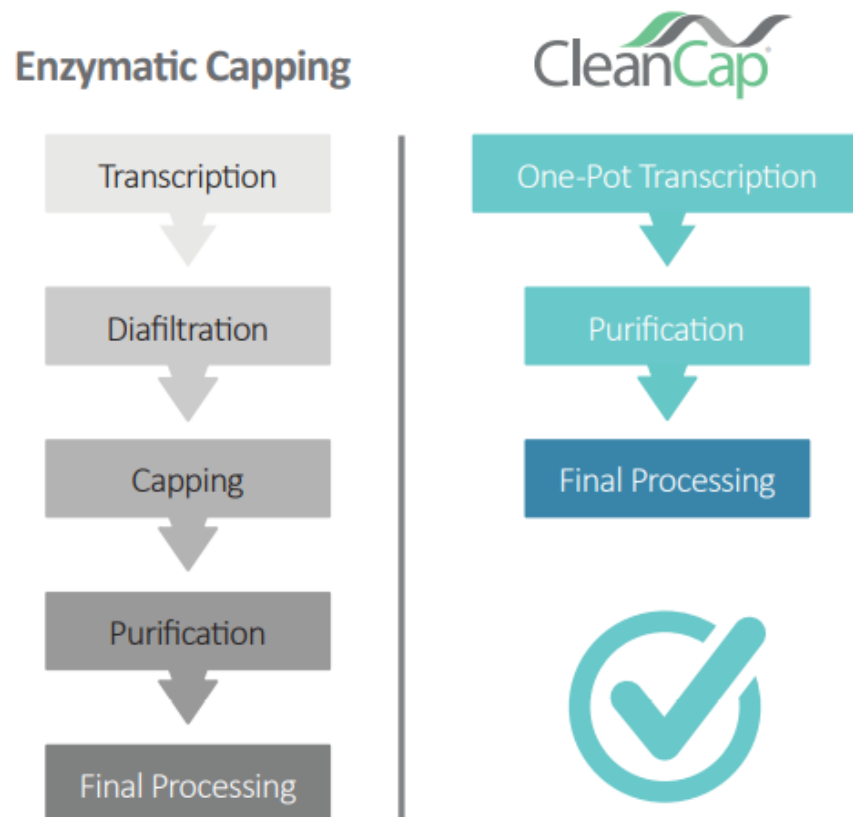


Figure 8. La technologie CleanCap® vs capping enzymatique (70)

Figure 8 : La technologie CleanCap® est une solution brevetée de coiffage de l'ARNm en 5' qui permet une fabrication robuste, à haut rendement et hautement évolutive pour le développement de vaccins et de thérapies à base d'ARNm. Contrairement aux méthodes traditionnelles (enzymatiques), CleanCap offre un processus de coiffage co-transcriptionnel, à un seul pot, qui raccourcit le temps de fabrication et génère la structure optimale de Cap1 pour obtenir une meilleure activité in vivo de l'ARNm à visée thérapeutique.

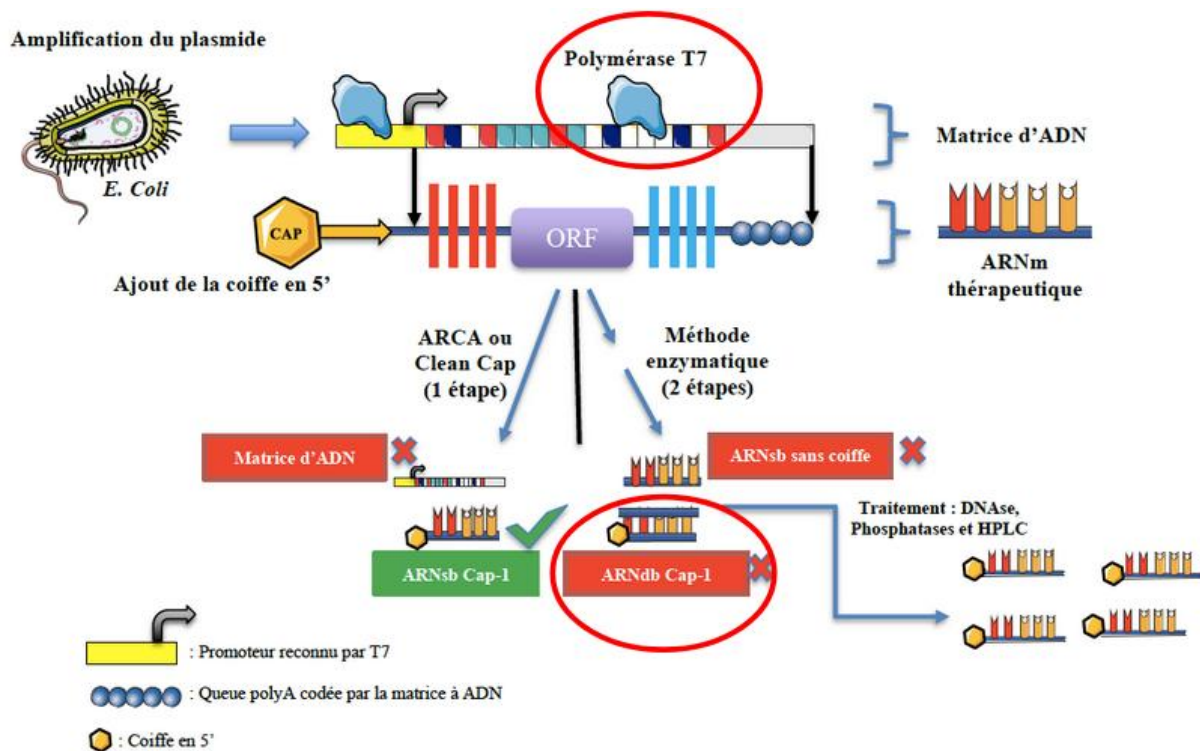


Figure 9. Processus in vitro de fabrication et de purification des ARNm thérapeutiques

Figure 9 : La séquence d'ADN complémentaire (ADNc) de l'antigène codant pour l'antigène pathogène ciblé est utilisée pour élaborer soit un vecteur de transcription, soit un fragment PCR comprenant l'information complète de l'ARNm plus un promoteur ARN T7 en amont. Le plasmide linéarisé ou les produits de la PCR sont utilisés pour la production d'ARNm thérapeutique en utilisant l'ARN polymérase T7 en présence ou en l'absence de nucléosides modifiés. Le coiffage de l'ARNm est réalisé soit en une étape pendant la transcription en présence d'analogues de CAP (ARCA, Clean-Cap, Figure 8), soit en deux étapes, après la production de l'ARNm, par une réaction de coiffage enzymatique. Ensuite, les produits de réaction contenant la matrice d'ADN, l'ARN double brin (ARNdb) et l'ARN simple brin (ARNsb) coiffé et non coiffé sont purifiés. Au cours de la purification, la matrice d'ADN est éliminée par traitement à la DNase, les ARN non coiffés 5' triphosphorylés sont déphosphorylés en ARN 5'OH (si nécessaire), les ARNdb sont éliminés par purification par HPLC pour obtenir une solution pure et homogène de l'ARNm d'intérêt. La dernière étape est la formation d'un nanocomplexe d'ARNm pour une délivrance cellulaire et une traduction efficace du transcrit.

La pureté des vaccins à ARNm est un paramètre critique à leur efficacité et à leur immunogénicité. Ceux-ci étant des produits pharmaceutiques, ils doivent répondre à des normes de pureté. La purification par HPLC peut éliminer l'ARNdb résultant du processus de fabrication *in vitro*. Cependant, l'HPLC en phase inverse par paires d'ions (formation d'un ensemble neutre et apolaire) présente quelques inconvénients. L'inconvénient principal étant le coût onéreux de l'équipement et des réactifs. D'autres inconvénients tels que la difficulté à étendre le processus de manière rentable, le traitement des déchets (solvants toxiques ex : l'acétonitrile), la perte de rendement d'ARNm (environ 50% de récupération), et la longue durée de purification.^(59,68)

Le développement d'une nouvelle méthode de chromatographie à base de cellulose permet l'élimination des contaminants ARNdb des ARNm transcrits *in vitro* quelle que soit la longueur, la séquence codante et la composition en nucléotides nucléosides. Cette méthode s'avère être comparable à l'HPLC, tout en se débarrassant de ses inconvénients. Elle est basée sur la liaison sélective de l'ARNdb à la poudre de cellulose en présence d'une solution contenant de l'éthanol. Cette technique permet d'éliminer à hauteur de 90% d'ARNdb.⁽⁶⁸⁾ La chromatographie sur cellulose décrite représente donc une méthode rentable et simple pour éliminer les contaminants d'ARNdb, résultant en un ARNm thérapeutique pur d'une qualité similaire à l'ARNm purifié par HPLC.

2.2.2 Systèmes de délivrances

Lors de leur première utilisation en 1990, les molécules d'ARNm injectées à la souris étaient nues, sans système de délivrance.⁽⁴⁴⁾ Or, la vectorisation est un élément clé à la formulation de l'ARNm dans la protection contre le système immunitaire inné afin d'en optimiser l'efficacité thérapeutique. Les méthodes et les véhicules pour la délivrance intracellulaire restent le principal obstacle à l'application de l'ARNm en thérapie.⁽⁷¹⁾ À la différence des petits oligonucléotides (4-10kDa), ou d'autres types d'ARN interférents (siARN d'environ 14kDa), l'ARNm est une grande molécule (pouvant atteindre 300 à 5000kDa [soit 1 à 15kb]).⁽²⁶⁾

2.2.2.1 Constitution de la barrière cellulaire

Pour pouvoir agir, l'ARNm doit atteindre le cytoplasme cellulaire, qui est séparé du milieu extracellulaire par la membrane cellulaire. Il s'agit d'une barrière dynamique et difficile à franchir par les molécules à visée intracellulaire. Elle est principalement constituée d'une bicouche phospholipidique zwitterioniques (car celle-ci comporte une charge négative sur le groupe phosphate et une charge électrique positive sur l'ammonium quaternaire, résultant d'une charge globale nulle). Les têtes polaires de phospholipides sont orientées vers l'extérieur et l'intérieur de la cellule et dont les queues hydrophobes constituent l'intérieur de la bicouche. La membrane est également constituée de protéines, telles que des pompes et canaux ioniques qui permettent le maintien d'un potentiel négatif d'environ -60mV, et maintiennent une charge négative dans l'espace cytoplasmique en contrôlant l'équilibre des concentrations d'électrolytes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} etc.)^(72,73) Les molécules d'ARNm chargée négativement sont bloquées par ce potentiel négatif qui forme une barrière très difficile à franchir par ces molécules. Hormis les phospholipides, on retrouve également des lipides insaturés, en particulier à double liaison *cis*, qui permettent d'augmenter la fluidité membranaire.

Dans le cadre de l'administration de vaccins à base d'ARNm, avant d'atteindre la membrane cellulaire, les molécules d'ARNm peuvent être dégradées par des ribonucléases présentes en abondance dans les milieux extracellulaires et donc en limiter l'efficacité.⁽⁷⁴⁾

2.2.2.2 La Formulation en Nanoparticules Lipidiques (LNP)

Pour protéger les vaccins à ARNm contre la dégradation aux nucléases et pour dissimuler sa charge négative et permettre son passage à travers la membrane cellulaire, l'une des méthodes les plus utilisées pour délivrer les ARNm est la co-formulation avec des nanoparticules lipidiques (LNP).⁽⁷⁵⁾ Les vecteurs viraux ont une efficacité de transfection élevée mais ont le potentiel de provoquer des réponses immunitaires indésirables.⁽⁷⁶⁾ L'évaluation des vecteurs non viraux est particulièrement d'actualité compte tenu de l'approbation par le comité consultatif de l'ADN recombinant de permettre à la thérapie génique à médiation virale de progresser dans le cadre clinique, une décision qui a été rigoureusement examinée.⁽⁷⁷⁾ Par conséquent, les véhicules de délivrance basés sur des espèces cationiques non virales, telles que les lipides et les polymères, sont devenus une alternative intéressante car ils sont capables d'envelopper différents types d'acides nucléiques, de les

délivrer à travers la membrane plasmique et de faciliter la fuite endosomale de la molécule thérapeutique.^(78,79)

C'est la technologie des nanoparticules lipidiques qui a été choisie pour le développement des vaccins à base d'ARNm. Les nanoparticules lipidiques (LNP) formées par un lipide cationique ionisable, des lipides auxiliaires (distéarylphosphatidylcholine, (DSPC) et cholestérol) et un lipide polyéthylène glycol (PEG) ont été identifiées comme des vecteurs de délivrance très prometteurs d'ARN interférents courts dans différentes phases cliniques⁽⁸⁰⁾. Cependant, la délivrance d'ARNm de poids moléculaire élevé tels que les ARNm vaccinaux s'est avérée beaucoup plus exigeante.

En 2018, Arteta *et al.*⁽⁸⁰⁾ conçoivent des nanoparticules lipidiques qui permettent une amélioration de la production de protéines intracellulaires dans deux types de cellules cliniquement pertinentes et fournissent un cadre pour comprendre et optimiser les véhicules pour délivrer d'ARNm. D'après leurs travaux de recherche, la taille et la structure des LNP ont une influence significative sur la production de protéines intracellulaires. Par exemple, dans les adipocytes et hépatocytes humains, les niveaux d'expression des protéines pour les LNP de 130nm diffèrent jusqu'à 50 fois en fonction de leurs caractéristiques de surface, probablement en raison d'une différence dans leur capacité de fusion avec la membrane endosomale.

Les LNP sont composées d'un lipide ionisable ou cationique ou d'un matériau polymère portant des amines tertiaires ou quaternaires pour encapsuler l'ARNm ; d'un lipide zwitterionique (ex : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DOPE]) mimant les lipides de la membrane cellulaire ; le cholestérol ; un polyéthylène glycol (PEG)-lipide pour conférer une couche hydratante à la nanoparticule, améliorer la stabilité colloïdale et réduire l'absorption des protéines (*Figure 10*). La stratégie de fonctionnalisation des LNP avec du PEG découlait en grande partie de l'observation d'une faible durée de vie des LNP dans la circulation après administration intravasculaire.^(78,81) Ces nanoparticules lipidiques, une fois administrées, sont endocytées et peuvent se fixer et fusionner avec la membrane cellulaire.⁽⁸⁰⁾ L'endocytose des LNP dépend de la clathrine¹ et d'une macropinocytose². Une fois dans le milieu cytoplasmique, les LNP sont emmenés vers les endosomes précoces, qui deviennent tardifs (avec une acidification progressive du milieu endosomal) avant de fusionner avec les lysosomes où le contenu de l'ARNm est dégradé par des enzymes.⁽⁸²⁾

¹ Protéine structurelle enrobant les vésicules endocytées

² Invagination de la membrane cellulaire par la mobilisation de filaments d'actine du cytosquelette

Après administration intramusculaire du vaccin à ARNm co-formulé avec des LNP, celles-ci fusionnent et sont endocytées dans les cellules et plus particulièrement dans l'endosome. L'ARNm vaccinal piégé doit subir une fuite endosomale et être libéré dans le cytosol afin de pouvoir jouer son rôle et être traduit en protéine antigénique. Une hypothèse suggère qu'un petit pourcentage des nanoparticules lipidiques échapperait à la dégradation endosomale via « l'effet éponge à protons » qui est basé sur des polymères cationiques ou des lipides avec un excès de groupes amines protonables non chargés qui peuvent tamponner l'acidification endosomale en absorbant les protons dans le compartiment endolysosomal.⁽⁸³⁾ Cette hypothèse est en cours d'évaluation, cependant des travaux de recherches plus récents démontrent que l'intervention de facteurs plus complexes que l'effet éponge à protons classique pourrait intervenir dans l'échappement endosomale des LNP.

Plusieurs matériaux sont utilisés et étudiés pour la délivrance non-virale d'ARNm à visée thérapeutiques (les lipides ionisables, les polymères, les dendrimères, les peptides pénétrant dans les cellules etc). Les défis majeurs des LNP sont la biodégradabilité et le ciblage de ces vecteurs. Il existe des systèmes de défense, tels que le système phagocytaire mononucléaire dans le foie et la rate qui jouent un rôle natif dans la surveillance de l'organisme contre des agents infectieux de taille nanométriques, au même titre que le rein qui filtre les nanoparticules de tailles inférieures à 6nm.⁽⁸⁴⁾ De plus, les grands LNP cationiques ne parviennent pas à s'extravaser des capillaires pulmonaires et ne peuvent pas être filtrés de la circulation sanguine par le rein, cela pouvant conduire à une accumulation de biomatériaux de nanoparticules dans certains organes si la clairance et la biodégradabilité de ces composants ne sont pas prise en considération lors du développement de ces matériaux de délivrance d'ARNm. Il s'avère que la conception de lipides dégradables ou de polymères à base de polyesters ou de polycarbonates offrirait un meilleur contrôle de la dégradation des systèmes de délivrance.⁽⁸⁵⁾

Relativement à l'impact de la taille de LNP, une observation importante basée sur les données rapportées de deux différentes études est que la différence d'absorption cellulaire de LNP de taille variable est plutôt modeste. En effet, Gao *et al.*⁽⁸⁶⁾ et Zhang *et al.*⁽⁸⁷⁾ ont proposé des modèles théoriques pour expliquer l'endocytose des nanoparticules en fonction de leur taille. Les deux études ont conclu que la taille optimale des particules pour l'absorption était d'environ 50-60 nm. Il a été suggéré que les particules plus petites étaient absorbées moins efficacement en raison de la pénalité énergétique de la courbure de la membrane, tandis que l'absorption de particules plus grandes est limitée par la vitesse de diffusion du récepteur dans le plan de la membrane plasmique jusqu'au site d'absorption des nanoparticules

2.2.2.3 Délivrance des vaccins à ARNm

Les complexes LNP sont la plateforme la plus utilisée et présentent les meilleurs résultats dans la délivrance d'ARNm. Les LNP jouent un rôle dans la protection de l'ARNm et permettent également une meilleure absorption cellulaire, améliorant l'échappement endosomal et permettant la délivrance cytoplasmique. Pour les vaccins à base d'ARNm, des supports efficaces et atoxiques tels que les lipides ou les matériaux à base de polymères ont été développés (*Figure 10*). Les effets de l'IFN sur les vaccins à ARNm sont un sujet de débat. Il a été démontré que l'activation des IFN de type I par l'ARNm inhibait la traduction ultérieure des protéines, confirmant que l'inhibition peut ensuite conduire à une diminution de l'activation de la réponse immunitaire adaptative (lymphocytes T CD8⁺).⁽⁸⁸⁾ La modification des nucléotides ou la purification des molécules d'ARNm a été utilisée pour diminuer l'activation du système immunitaire inné (réponse IFN) (*Cf. 2.1.1*). Au contraire, il a été rapporté que l'injection IV de complexes ARNm-lipides non modifiés chez des patients atteints de mélanome augmenterait la stimulation des lymphocytes T par l'activation médiée par le TLR 7 (récepteur de type Toll 7) de l'IFN de type I.⁽⁸⁹⁾ Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la cinétique de signalisation des IFN de type I vis-à-vis de l'activation des récepteurs T (TCR de l'anglais *T-cell receptor*).

Effectivement, si l'activation du TCR précède ou coïncide avec la signalisation de l'IFN de type I, l'activation de la réponse innée faciliterait la réponse immunitaire adaptative désirée ; sinon, cela limiterait l'activité des lymphocytes T.

Par conséquent, l'optimisation des voies d'administration des vaccins à base d'ARNm a été étudiée. En effet, Le résultat de la signalisation de l'IFNAR sur l'immunité des cellules T contre les vaccins à ARNm semble être très divergent, entraînant une stimulation importante des cellules T CD8⁺ par injection intraveineuse (IV) mais une puissante inhibition par injection intradermique (ID). Les mécanismes à l'origine de ce résultat différentiel ne sont pas encore élucidés et méritent d'être étudiés davantage. Dans les infections virales, l'effet des IFN de type I sur l'immunité des Lymphocytes T CD8⁺ est largement déterminé par la cinétique relative de la signalisation de l'IFNAR et du TCR. La signalisation de l'IFNAR avant l'activation du TCR empêche l'activation des cellules T, alors que l'activation simultanée de l'IFNAR et de la signalisation du TCR favorise fortement la prolifération des cellules T et la différenciation des effecteurs. Des mécanismes similaires pourraient fonctionner au niveau des cellules T CD8⁺ pour les vaccins à ARNm et expliquer l'impact

différentiel des IFN de type I sur l'immunité des cellules T CD8⁺ dans les voies d'administration ID ou IV, en termes de vitesse de présentation de l'antigène. En outre, des formulations d'ARNm et des voies d'administration différentes pourraient imposer des résultats différentiels du déclenchement des IFNAR sur les cellules dendritiques, affectant ainsi indirectement l'immunité des cellules T CD8⁺.⁽⁸⁸⁾ Une administration IV de LNP d'ARNm codant pour des antigènes tumoraux pour une immunothérapie contre le mélanome est en phase II d'essai clinique. Cet essai clinique est évalué par la société Allemande, BioNTech.⁽⁹⁰⁾

Une autre stratégie pour ajuster la cinétique consiste à utiliser différents composants de délivrances pour activer la réponse interféron. L'utilisation d'un complexe de protamine utilisé par CureVac, (Tubingue, Allemagne), pour activer la voie IFN de type I, tandis que l'ARNm stabilisé libre est utilisé pour l'expression de l'antigène d'intérêt. CureVac a développé la plateforme vaccinale RNActive basée sur des complexes d'ARN formulés à base de protamine. Ceux-ci sont agonistes des récepteurs de type Toll 7/8 pour induire une réponse des lymphocyte T, tandis que l'ARNm modifié fonctionne comme un producteur d'antigènes⁽⁹¹⁾

ci-dessous, sont présentées les principales différences divulguées dans les caractéristiques de production d'ARNm. La séquence d'ARN de la plateforme « modRNA » de BioNTech/Pfizer (utilisée pour leur candidat vaccin : BNT162b2) est constituée des motifs 5' de la région non traduite (UTR) de l' α -globine humaine, de l'activateur amino-terminal de la fraction (AES de l'anglais *amino-terminal enhancer of split*) et des motifs 3' UTR⁽⁶³⁾ de mtRNR1, et d'une queue poly(A) constituée de A30LA70 (lieur [L] : GCAUAUGACU)⁽⁹²⁾, tandis que les séquences d'ARNm développées par Moderna (mRNA-1273, mRNA-1273.211, mRNA-1273.351), ne sont pas entièrement divulguées. Le coiffage en 5' de BNT162b2 a été effectué de manière co-transcriptionnelle à l'aide d'un analogue trinuécléotidique de Cap-1 ((m27,3'-O)Gppp(m2'-O)ApG) (TriLink)⁽⁹²⁾, tandis que Moderna a utilisé le coiffage enzymatique pour obtenir le cap1 pour son ARNm-1273 préclinique.⁽³³⁾

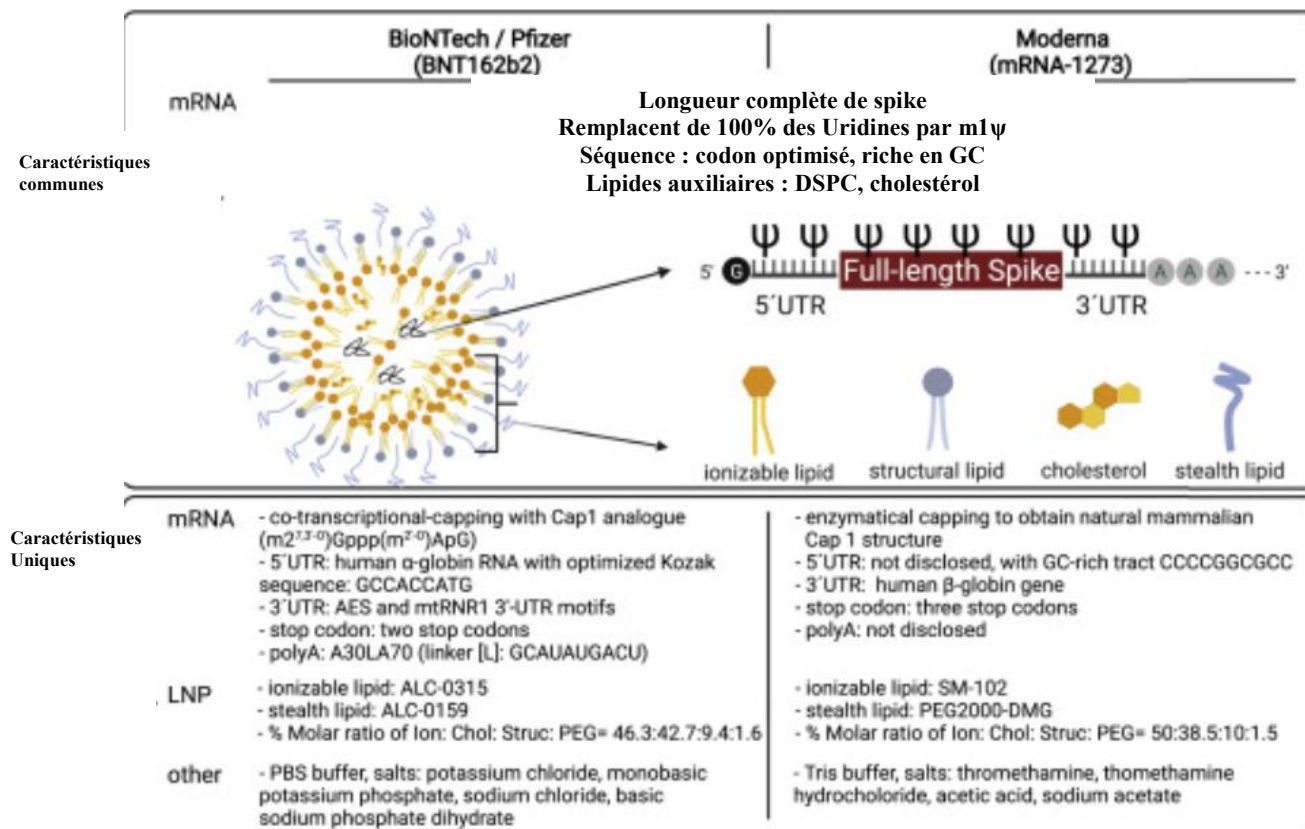


Figure 10. Les vaccins anti-COVID-19 à base d'ARNm largement utilisés : Comparaison des différents composants(93)

Figure 10 : Pour protéger les vaccins à ARNm contre la dégradation aux nucléases et pour dissimuler sa charge négative et permettre son passage à travers la membrane cellulaire, les vaccins à bases d'ARNm ont été co-formulés avec des nanoparticules lipidiques (LNP).

Les LNP sont composées d'un lipide ionisable ou cationique ou d'un matériau polymère portant des amines tertiaires ou quaternaires pour encapsuler l'ARNm ; d'un lipide zwitterionique mimant les lipides de la membrane cellulaire ; le cholestérol ; d'un lipide furtif (ou stealth lipid) ; d'un polyéthylène glycol (PEG)-lipide pour conférer une couche hydratante à la nanoparticule, améliorer la stabilité colloïdale et réduire l'absorption des protéines

Ce qui est important à retenir ici est que les huit ARNm modifiés par des nucléosides sont formulés à l'aide de l'un des trois types de LNP provenant d'Acuitas (Vancouver, BC, CA), Moderna (Cambridge, MA, USA) et Genevant (Vancouver, BC, CA), qui consistent en quatre composants : lipides ionisables, lipides structuraux, lipides furtifs et cholestérol.

3 Mode d'Action des vaccins à ARNm

Afin de décrire le type de réponse immunitaire induite par les vaccins à ARNm, nous avons choisi de prendre comme modèle d'étude les vaccins à ARNm anti-SARS-CoV-2: avec comme exemple le vaccin Comirnaty® (Tozinameran). Il s'agit du 1^{er} vaccin à ARNm à avoir obtenu son AMM en prévention de l'infection à la COVID-19 dans des procédures d'urgence face à la pandémie par les autorités de santé en Europe et aux Etats-Unis.

Des études sur la structure et sur les interactions du SARS-CoV-2 avec sa cible cellulaire (le récepteur ACE2 à la surface des cellules pulmonaires) permettent de comprendre le mécanisme du virus afin de développer des thérapies basées sur la structure. ⁽⁹⁴⁾ (Figure 11).

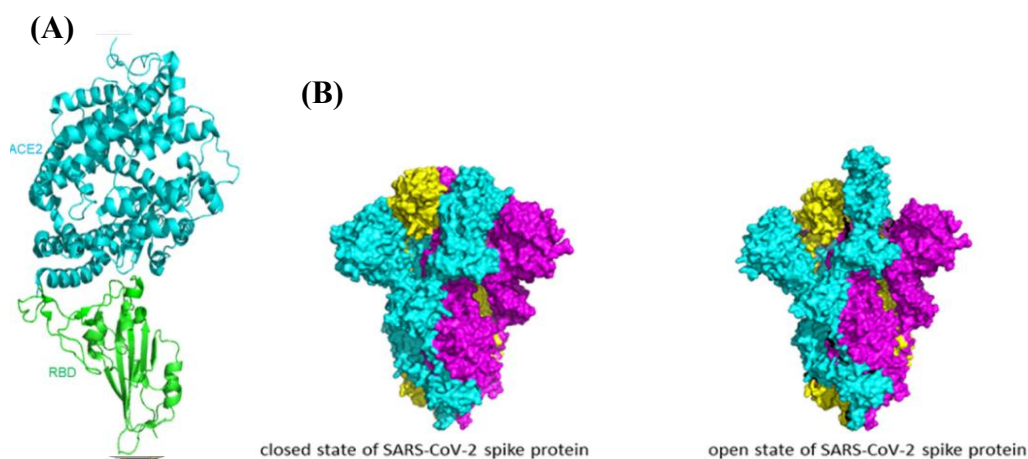


Figure 11. (A) Représentation de l'interaction du SARS-CoV-2 avec le RBD (B) Microscopie électronique cryogénique de la protéine S (94)

Figure 11 : (A) La structure globale de SARS-CoV-2 RBD liée à ACE2. ACE2 est coloré en cyan, le cœur de SARS-CoV-2 RBD est coloré en vert (PDB : 6M0J) (B) Structure en microscopie électronique cryogénique (cryo-EM) de la protéine de spicule du SARS-CoV-2. L'état fermé (PDB : 6VXX) de la glycoprotéine S de SARS-CoV-2 (gauche) ; l'état ouvert (PDB : 6VYB) de la glycoprotéine S de SARS-CoV-2 (droite).

L'entrée du virus dans une cellule nécessite que la protéine *spike* se fixe au récepteur cellulaire ACE2. Une fois cette liaison établie, la sous-unité S1 est libérée et un clivage enzymatique se produit au niveau du site S2. Ce processus aboutit à l'insertion d'une sous-région de la protéine *spike* dans la membrane cellulaire et à la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule. C'est pour cette raison que cette région dans la

protéine *spike* jouant un rôle crucial dans l'entrée du virus est appelée peptide de fusion. La protéine spicule du SARS-CoV-2 est un trimère qui contient un RBD qui reconnaît spécifiquement le récepteur ACE2. Le RBD est une cible essentielle pour les composés antiviraux et les anticorps. Des thérapies basées sur la structure et les interactions du virus avec sa cible cellulaire ont pu être développées, et notamment des anticorps monoclonaux.

Exemple du Méplazumab⁽⁹⁴⁾ :

Récemment, l'étude indique que le SARS-CoV-2 envahit les cellules hôtes par une nouvelle voie : la voie CD147-protéine spicule (S), par laquelle la protéine S se lie à CD147, une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, médiant ainsi l'invasion du virus. Le méplazumab est un anticorps humanisé anti-CD147. Il peut bloquer le CD147 et empêcher de manière significative le SARS-CoV-2 de pénétrer dans les cellules hôtes. Contrairement à l'ACE2, le CD147 est fortement exprimé dans les tissus enflammés, les cellules infectées par des agents pathogènes et les tissus tumoraux. Il présente une faible réaction croisée avec les cellules saines. Par conséquent, les médicaments ciblant le CD147 sont sûrs et fiables. ⁽⁹⁴⁾

3.1 Critères d'immunogénicité et d'évaluation des vaccins anti-SARS-CoV-2

Les critères d'immunogénicité et d'évaluation des vaccins anti-SARS-CoV-2 impliquent qu'en l'absence de corrélats de protection, les réponses immunes protectrices aux vaccins devraient inclure, comme l'a recommandé l'OMS en 2020, des anticorps neutralisants (AcN) dirigés contre la protéine spike (S) (ou RBD) associées à des réponses cellulaires de type Th1, mais non de type Th2.

Décrite tout d'abord chez la souris, la distinction de deux sous-populations lymphocytaires, Th1 et Th2 se base sur le profil de sécrétion des cytokines. La réponse Th1 se caractérise par les sécrétions d'IL-2, TNF- α et IFN- γ (sous type d'IFN de type I) et intervient essentiellement dans les réactions de type cellulaire alors que la réponse Th2 est responsable de la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et joue un rôle dans la réponse humorale. Chez l'Homme, on parlera plutôt de polarisation globale de la réponse inflammatoire. À la suite d'un contact avec un agent pathogène infectieux ou un antigène, les cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire sont activées. Lorsqu'elles rencontrent des lymphocytes T CD4, CD8 et des lymphocytes B naïfs spécifiques au niveau des follicules

lymphatiques, une réponse immunitaire ciblée est induite. Tandis que les lymphocytes T CD8 se différencient en T CD8 effecteurs cytotoxiques, les LT CD4 se subdivisent principalement en LT auxiliaires Th1 et Th2. Une polarisation Th2 semble caractériser les manifestations allergiques, s'agissant d'asthme, de rhinite allergique ou d'eczéma. Tandis qu'une réponse immunitaire de type Th1 se produit après contact du système immunitaire avec un agent pathogène bactérien ou viral, une réaction médiée par les lymphocytes Th2 figure au premier plan en cas de cause allergique ou parasitaire.

Par ailleurs, les vaccins devraient utiliser une formulation capable d'induire rapidement des taux élevés d'anticorps neutralisants avec un ratio anticorps neutralisants/anticorps totaux le plus élevé possible afin de minimiser les risques d'exacerbation de la maladie. Il serait préférable d'éviter les adjuvants inducteurs de réponses de type Th2. Le potentiel d'immunogénicité et d'efficacité vaccinale devra donc être démontré en phases de développement pré-clinique et clinique sur les titres en anticorps neutralisants et les réponses de type Th1, ainsi que sur l'absence de réponses Th2.

De surcroît, des modèles animaux pertinents devront évaluer la valeur protectrice de ces réponses immunes face à l'infection et minimiser le risque de facilitation de l'infection par des analyses histopathologiques détaillées des tissus pulmonaires, entre autres.⁽⁹⁵⁾ Idéalement, un modèle animal doit être susceptible à l'infection par le pathogène cible ; permettre de reproduire la physiopathologie de l'infection chez l'Homme ; disposer d'un système immunitaire dont les mécanismes ont été suffisamment étudiés et pour lesquels des systèmes d'études *in vitro* sont facilement disponibles ; induire des réponses immunitaires qui ressemblent étroitement à celles obtenues chez l'Homme ; être facile à entretenir.⁽⁹⁶⁾

Dans le contexte du développement des vaccins à base d'ARNm anti-SARS-CoV-2, une preuve de concept était réalisée sur la souris. Compte tenu de ces résultats prometteurs et en raison du besoin urgent d'un vaccin dans le cadre d'une pandémie galopante, Pfizer et Moderna ont reçu l'autorisation de tester simultanément leurs vaccins sur des animaux tout en menant des essais de phase I sur des humains. Ces vaccins ont été testés sur des souris et des primates non humains. Si l'ARNm est une nouvelle technologie, les experts y travaillent depuis des années.

3.1.1 Les vaccins à ARNm au service de la pandémie du SARS-CoV-2

En combinaison avec les LNP, l'ARNm modifié est désormais la base de la plateforme de vaccins à ARNm distincte, qui s'est avérée la plus efficace en raison de sa réponse immunitaire optimale provenant du compromis entre la fonction adjuvante des LNP et l'ARNm modifié, permettant une efficacité et une sécurité améliorées. L'un des principaux avantages de la plateforme de vaccins à ARNm est leur potentiel de conception et de rapidité de production, ce qui en fait d'excellents candidats vaccins pendant la pandémie de COVID-19.

En décembre 2019, un cluster de patients atteints de pneumonies de cause inconnue a été lié à un marché de fruits de mer à Wuhan, en Chine. Un séquençage du génome du virus par technique de transcription inverse suivie d'une amplification (RT-PCR) sur prélèvements salivaires de patients malades a permis la découverte d'un β -coronavirus jusque-là inconnu par la communauté scientifique. Ce nouveau virus est nommé 2019-nCoV, différent de ses prédécesseurs du XXI^{ème} siècle : SARS-CoV (2002-2003) et MERS-CoV (2012). Il est le 7^{ème} membre de la famille des coronavirus infectant l'espèce humaine.⁽⁹⁷⁾ L'isolement du virus a été réalisé avec des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines et des lignées cellulaires Vero E6 et Huh-7.

En réponse à l'épidémie, plusieurs pays, dont la Thaïlande, ont mis en place des caméras thermiques à l'aéroport pour les voyageurs en provenance de Wuhan dès le 3 janvier. Les 8 et 13 janvier, des cas suspects d'infections par le SARS-CoV-2 ont été identifiés à l'aéroport Suvarnabhumi de Bangkok.⁽⁹⁸⁾ Ces deux cas décrits testés positifs au SARS-CoV-2 étaient les premiers cas exportés de Chine confirmés, suggérant une propagation internationale précoce du virus. Une réponse rapide comprenant le séquençage et le partage du génome via GISAID (*global initiative on sharing avian influenza data*) a permis une diffusion rapide des résultats et a fourni un aperçu des premiers schémas de transmission dans cette épidémie.

WIV04 (séquence de référence officielle employée par GISAID)⁽⁹⁹⁾ a été isolé par l'institut de virologie de Wuhan à partir des échantillons de LBA des patients infectés par le virus. Ceux-ci ont servis à l'extraction d'ARN et au séquençage métagénomique de nouvelle génération (NGS). La séquence consensus a été obtenue par assemblage de novo.

La séquence génomique du SARS-CoV-2 à l'origine du COVID-19 a été publiée le 11 janvier 2020⁽⁹⁹⁾, ce qui a déclenché une accélération de l'activité mondiale de recherche et développement pour développer un vaccin. En effet, l'ampleur de l'impact humanitaire et économique de la pandémie du COVID-19 a conduit à l'évaluation des plateformes technologiques de vaccins de nouvelle génération grâce à de nouveaux paradigmes pour accélérer le développement.

Les vaccins à ARNm ont l'avantage de pouvoir être produits rapidement, sans cellules, en grande quantité et pourraient être facilement modifiés, si nécessaire, face à d'éventuelles mutations d'échappement portées par de nouveaux variants. Le 1^{er} candidat vaccin de Moderna (Cambridge, MA, USA) est entré en essais cliniques chez l'Homme avec une rapidité sans précédent, le 16 mars 2020, suivi de près par le vaccin de Pfizer BioNTech, le 22 avril 2020. Le COMIRNATY® reçoit une autorisation sur le marché (AMM) Européenne conditionnelle le 21 Décembre 2020, soit moins d'1 an après la découverte du SARS-CoV-2. Une des questions posées fréquemment est de savoir comment un vaccin aurait pu être réalisé en si peu de temps, sachant que le délai pour d'autres vaccins se mesurent en plusieurs années, voire décennies.

L'approche des vaccins à base d'ARNm a évolué sur plusieurs années grâce aux travaux de scientifiques parmi lesquels : le Dr. Drew Weissman et le Dr. Katalin Kariko, ainsi qu'aux efforts concentrés de plusieurs sociétés biotechnologiques et pharmaceutiques.⁽¹⁰⁰⁾

La découverte d'un immunogène adaptable aux multiples plateformes (on compte quatre principales plateformes de vaccins à ARNm : l'ARNm modifié et non modifié par les nucléosides, l'ARN circulaire et l'ARN auto-amplifié)⁽⁹³⁾ utilisées pour développer les vaccins contre la COVID-19 résulte d'une collaboration entre différentes sous-spécialités scientifiques. Au centre de recherches sur les vaccins (CRV) de l'institut national américain des allergies et des maladies infectieuses (NIAID) (Montgomery, Alabama, USA), l'équipe de Peter Kwong utilisait depuis plusieurs années des outils de conception de vaccins basés sur la structure pour déterminer la conformation structurelle optimale d'une protéine trimérique à la surface du virus (protéine d'enveloppe) qui permettrait au VIH de se lier aux cellules et d'induire la production d'anticorps neutralisants de nombreuses souches virales du VIH. Bien que cette approche sophistiquée n'ait pas encore abouti à un vaccin efficace contre le VIH, elle a été reprise par un autre chercheur du CRV, Barney Graham, qui souhaitait développer

un vaccin contre le virus respiratoire syncytial (VRS). Graham a rejoint Jason McLellan (de l'équipe de Peter Kwong) pour adapter l'approche basée sur la structure, à un vaccin contre le virus respiratoire syncytial.

Les chercheurs ont identifié la conformation de pré-fusion de la protéine virale « spike » comme hautement immunogène (*Figure 11*) et ont induits des mutations pour stabiliser cette conformation afin de l'utiliser comme immunogène. Cette innovation a permis le développement d'un vaccin efficace contre le virus respiratoire syncytial (VRS). L'équipe de Graham et des collaborateurs de laboratoires de McLellan ont adopté cette approche de stabilisation mutationnelle des protéines de pré-fusion dans leurs travaux sur la protéine spike des coronavirus qui causent le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) et le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS). Ainsi, le 11 janvier 2020, lorsque la séquence génétique de SARS-CoV-2 est devenue disponible, l'équipe de Graham a rejoint des chercheurs de Moderna pour développer un vaccin à base d'ARNm utilisant une protéine spicule de pré-fusion stabilisée comme immunogène.

Le vaccin COMINARTY® développé par Pfizer et BioNTech a également pu être développé en utilisant la plateforme d'ARN que Kariko et Weissman avaient perfectionné ainsi que l'immunogène conçu par Graham.

3.1.2 L'immunogénicité des vaccins à ARNm

L'immunogénicité intrinsèque des vaccins à ARNm peut être bénéfique s'il est contrôlé. En effet, la plupart des vaccins traditionnels ne parviennent pas à activer les récepteurs PRR, et nécessitent l'ajout d'adjuvants dans leur formulation pour évoquer des réponses effectrices.

La réponse immunitaire dépend fortement de l'immunogène. Pour les candidats vaccins contre le SARS-CoV-2, la protéine de spicule (S) contenant le domaine de liaison au récepteur (RBD) est considérée comme un bon antigène vaccinal car elle induit des anticorps neutralisants empêchant la fixation du virus aux cellules hôtes et l'infection *in vitro*. Les premiers résultats de phases précliniques (chez des modèles animaux : rongeurs ou primates non humains) ont démontré une capacité des vaccins à induire des anticorps neutralisants et des réponses cellulaires Th1. Dans leur étude, Zhang *et al.* ont démontré que leur vaccin

ARNm-LNP induit une réponse immunitaire cellulaire basée sur Th1. Ils ont montré une augmentation significative de lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques au virus (SARS-CoV-2) dans les splénocytes de souris vaccinées par leur candidat vaccin (ARCoV) par rapport aux LNP placebo. Ils ont également démontré une sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 significativement plus élevée chez les souris immunisées par rapport à celles qui avaient reçu le vaccin placebo⁽¹⁰¹⁾ Cette sécrétion cytokinique démontre une réponse de type Th1.

Ci-dessous est représenté le mécanisme d'action du vaccin à ARNm de Pfizer/BioNtech.

a) Mécanisme d'action et immunogénicité du vaccin Cominarty®

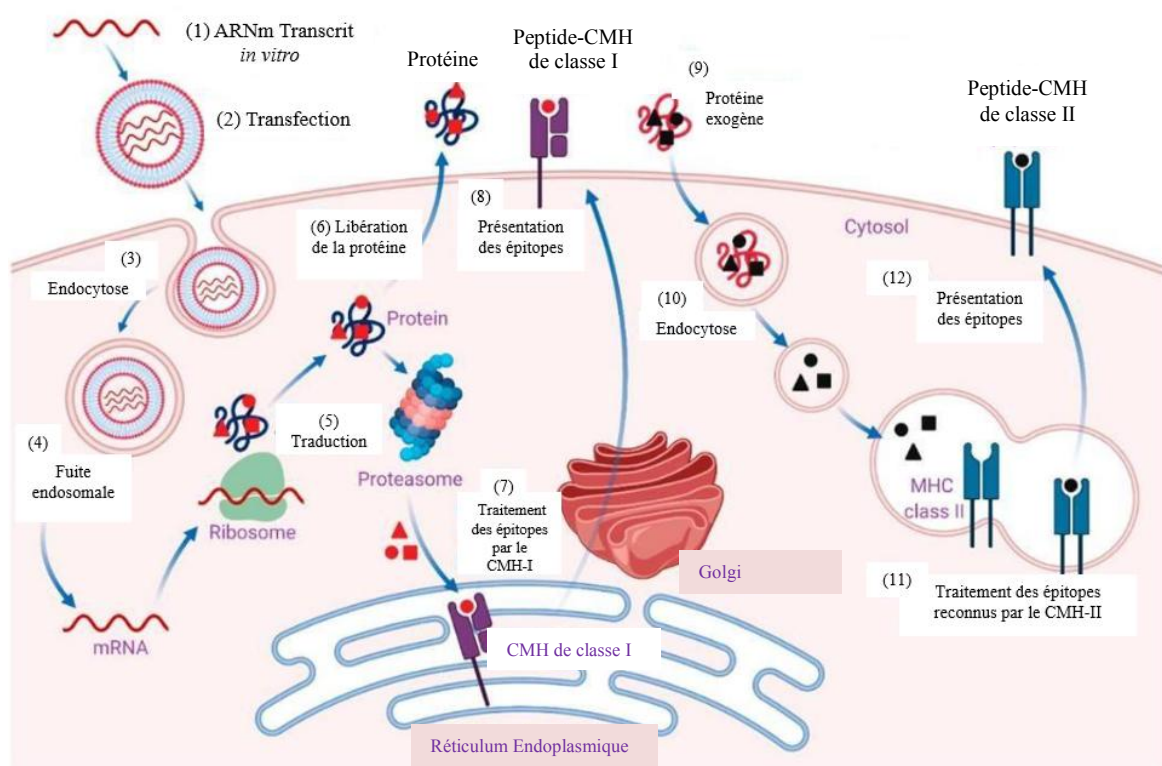


Figure 12. Principe du mécanisme d'action des vaccins à base d'ARNm

Figure 12 : (1) L'ARNm est transcrit *in vitro* (IVT) à partir d'une matrice d'ADN (DNA template) dans un système acellulaire (*cell-free system*). (2) L'ARNm est ensuite transfecté dans des nanoparticules lipidiques (LNP) (3) Après administration, les LNP d'ARNm sont endocytées dans les cellules dendritiques. (4) L'ARNm piégé subit une fuite endosomale et est libéré dans le cytosol. (5) En utilisant des ribosomes, l'ARNm est traduit en protéines antigéniques. La protéine antigénique traduite subit une modification post-traductionnelle et peut agir dans la cellule où elle est générée. (6) Sinon, la protéine est sécrétée par la cellule hôte. (7) La protéine antigénique est dégradée par le protéasome dans le cytoplasme. Les

épitopes peptidiques antigéniques générés sont transportés dans le réticulum endoplasmique et chargés sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). (8) Les complexes épitopes CMH I-peptide chargés sont présentés à la surface des cellules, conduisant finalement à l'induction de réponses des cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène après reconnaissance du récepteur des cellules T et co-stimulation appropriée. (9) Les protéines exogènes sont endocytées par les CD. (10) Elles sont dégradées dans les endosomes et présentées via la voie CMH II. De plus, pour activer les lymphocytes T auxiliaires, la protéine doit être apprêtée par la voie exogène pour être présentée par les molécules du CMH II. (11) Les épitopes peptidiques antigéniques générés sont ensuite chargés sur les molécules du CMH II. (12) Les complexes CMH II-peptide sont présentés à la surface des cellules, conduisant à l'induction des réponses des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'antigène. Les antigènes exogènes peuvent également être traités et chargés sur les molécules du CMH de classe I via un mécanisme connu sous le nom de présentation croisée

Le vaccin COMINARTY® de son nom expérimental (BNT162b2) est composé d'ARNm monocaténaire coiffé en 5' produit à partir d'une transcription *in vitro* acellulaire à partir des matrices d'ADN correspondantes, codant pour la protéine (S) du SARS-CoV-2. Ce vaccin à base d'ARNm possède des nucléosides modifiés et est formulé dans des LNP, qui permettent la délivrance de l'ARNm « non-répliatif » (cf 3.3) dans les cellules dendritiques pour diriger l'expression transitoire de la protéine S. L'ARNm code pour la protéine S ancrée à la membrane avec 2 mutations ponctuelles qui stabilisent S dans une conformation de pré-fusion.⁽¹⁰²⁾ Les LPN protègent l'ARNm non-répliatif de la dégradation et lui permettent d'être délivré dans les cellules hôtes. L'expression transitoire de la protéine S induit des anticorps neutralisants et des réponses immunitaires cellulaires, en faveur d'une protection contre la COVID-19.

En cours de développement, les résultats d'immunogénicité associés aux données d'innocuité ont soutenu la sélection de BNT162b2 à une dose de 30µg pour une évaluation internationale de phase II/III.⁽¹⁰³⁾ Le candidat vaccin a induit de fortes réponses anticorps chez les adultes âgés de 19 à 55ans (les IgG de liaison à l'anticorps et les réponses de neutralisation du virus étant généralement plus faibles dans le groupe de participants plus âgés [65-85ans]) dans un essai de phase I/II non randomisé et ouvert mené en Allemagne.⁽⁹²⁾ De plus, une expansion importante de LTCD4⁺ effecteurs spécifiques à la protéine S et des lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques a été remarquée chez la majorité des participants vaccinés.

Une efficacité protectrice était évaluée à 95% pour prévenir la COVID-19 chez les participants n'ayant aucune preuve d'infection antérieure ou existante par le SARS-CoV-2.⁽¹⁰⁴⁾ Simultanément, chez la plupart des participants, les cellules CD8⁺ spécifiques de la protéine S et les cellules T CD4⁺ de type Th1 s'étaient développées, avec une fraction élevée produisant de l'interféron de type gamma (IFN- γ). En utilisant des multimères peptidiques du CMH, les épitopes reconnus par plusieurs cellules T CD8⁺ induites par BNT162b2 lorsqu'ils sont présentés sur des allèles fréquents du CMH ont été identifiés. Il a été démontré que les cellules T CD8⁺ étaient du phénotype de mémoire effectrice à différenciation précoce, avec des spécificités uniques atteignant 0,01-3 % des cellules T CD8⁺ en circulation.⁽¹⁰⁴⁾ L'efficacité protectrice du candidat vaccin a été évaluée grâce au critère de déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative, humorale et cellulaire combinée, qui permet de contribuer à la protection contre la maladie de COVID-19.

3.2 Limites

- L'immunogénicité des vaccins à base d'ARNm

L'immunogénicité inhérente de l'ARNm peut être modulée à la baisse pour améliorer encore leur sensibilité. Bien que les LNP protègent les vaccins à base d'ARNm, seul un système de délivrance innovant n'est pas suffisant pour assurer une administration optimale de ces vaccins. Actuellement, des recherches actives sur l'optimisation de ces vaccins (modification nucléosidiques, évaluation des vecteurs nanoparticulaires, incorporation de nucléotides, modifications structurales etc) permettent d'accroître leur efficacité, leur capacité de traduction dans le temps et leur sûreté (*Cf 3.3*).

- Des vaccins à courte durée d'action

Les vaccins à ARNm conventionnels (non-réplicatifs ou non amplifiants) sont des molécules d'ARN basiques avec une structure simple (séquence codante pour l'antigène (ORF), régions 3' et 5' UTR, coiffe en 5' et queue polyA de longueur variable). Les avantages de cet ARNm conventionnel sont qu'il s'agit d'une molécule relativement simple et petite (2-3kb) et comme il code une seule protéine, la réponse immunitaire est spécifique. Cependant, la traduction de l'antigène étant limitée et transitoire, des doses répétées doivent être administrées pour obtenir une bonne efficacité vaccinale. La perte d'efficacité vaccinale du vaccin Comirnaty® dans le temps a été remarquée, aboutissant à la nécessité de réaliser des doses supplémentaires à des intervalles dont les recommandations différaient en fonction de la disponibilité des doses et des résultats des études en cours à travers le monde.

La nécessité de produire des vaccins à base d'ARNm efficaces est primordiale au développement d'un vaccin dans un contexte de pandémie aux conséquences dramatiques. (Figure 15) ⁽¹⁰⁵⁾

- Des conditions de conservations drastiques

Une des limites critiques est le manque de thermostabilité, limitant la distribution mondiale du vaccin. En effet, maintenir les vaccins dans une chaîne du froid est difficile dans les pays développés comme dans les pays en développement. La chaîne du froid contribuerait à elle seule à 80% de tous les coûts de vaccination.⁽¹⁰⁶⁾ Les molécules d'ARNm sont connues pour être plus sensibles. En effet, ceux-ci reposent sur une molécule d'ARNm sensible aux ribonucléases (omniprésentes dans le sang) et est susceptible d'être dégradée dans les LNP. De plus, les LNP sont conçues pour se dégrader progressivement. De vrais défis logistiques (comme la difficulté de stocker et de transporter les flacons en raison de la nécessité de conditions de stockage extrêmement froides) ont d'ailleurs été posés lorsque les laboratoires Pfizer/BioNTech ont annoncé une conservation des vaccins à -70°C.⁽¹⁰⁶⁾ Cependant, d'autres laboratoires utilisant aussi la technologie à base d'ARNm préconisaient une stabilité du vaccin entre 2 et 8°C. Il s'avère que la rapidité de développement du vaccin était la cause d'une telle prise de précaution « excessive » par un manque de temps pour réaliser les tests de stabilities. Cependant, une optimisation de leur thermosensibilité à long terme est nécessaire pour faciliter leur livraison et une vaccination massive dans le monde.

3.3 Innovations et optimisations des vaccins à ARNm face aux limites

Dans des études *in vitro*⁽⁶⁹⁾, il a été démontré que lorsqu'on incorpore des nucléosides modifiés naturels tels que : la pseudo-uridine (ψ), la 5-méthylcytidine (m5C), la N6-méthyladénosine (m6A), la 5-méthyluridine (m5U) ou la 2-thiouridine (s2U), les cellules dendritiques exposés à un tel ARN modifié expriment significativement moins de cytokines et de marqueurs d'activation que celles traitées avec de l'ARN non modifié. La plupart des récepteurs du système immunitaire inné reconnaissant normalement les ARN non modifiés n'étaient plus activés après au contact des ARN dont les nucléosides ont été remplacés par des nucléosides modifiés naturels. En effet, une forte diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires et de l'induction de molécules co-stimulatrices a été mesurés.⁽⁶⁹⁾

Hartman *et al.* ont montré que la pseudo-uridine et la 2-thiouridine inhibaient l'activation du récepteur RIG-I.⁽⁶⁰⁾ Kariko *et al.*⁽¹⁰⁷⁾ ont révélé que l'incorporation de pseudo-uridine dans l'ARNm supprime également l'activation immunitaire médiée par l'ARNm *in vivo*. De plus, le processus de fabrication *in vitro* d'un ARNm contenant des pseudo-uridines est facile, ce qui en fait un outil intéressant pour l'expression des protéines.⁽¹⁰⁷⁾

Les ARNm circulaires ont également été étudiés. Il s'agit de molécules d'ARN sb qui possèdent une stabilité améliorée et dont les motifs aux extrémités terminales ont été enlevés. Ces motifs, tels que le 5' triphosphate sont nécessaires à l'interaction avec diverses protéines cellulaires. Un article montre que l'ARN circulaire exogène non modifié est capable de ne pas être reconnu par les capteurs d'ARN cellulaires (RIG-I et TLR) chez la souris avec une durée d'expression des protéines prolongées par rapport à un ARNm linéaire. En effet, sa structure contiguë lui confère une résistance aux nucléases endosomales, ce qui entraîne l'évasion de ces détecteurs. La stabilité observée était cependant dépendante de certains tissus, mais il existe un réel potentiel de l'ARNm circulaire en tant que vecteur d'expression.⁽¹⁰⁸⁾

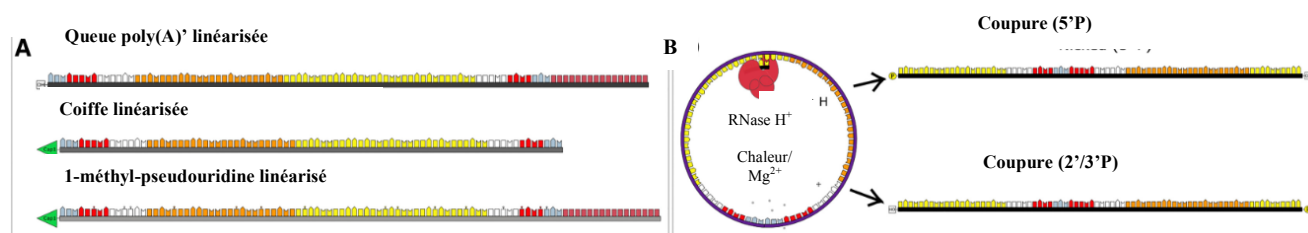


Figure 13. Schéma illustrant la linéarisation d'un ARNm circulaire⁽¹⁰⁸⁾

Figure 13 : (A) Les circRNA (ou ARNm circulaires) linéarisés contiennent tous les mêmes éléments de séquence que les circRNA épissés (B) Dégradation de l'ARNm circulaire par 2 procédés différents à la fois à la chaleur et la RNase H puis transfection de circARN dégradés et intacts.

Comme les ARNm linéaires coiffés en 5' et polyadénylés en 3' étaient capables de déclencher la sécrétion de cytokines, alors que les ARNm circulaire ne l'étaient pas, Wesselhoeft *et al.*⁽¹⁰⁸⁾ ont étudié la capacité de différents ARN à activer les TLR dans des lignées cellulaires rapporteuses. Les TLR 3, 7 et 8 sont connus pour détecter les ARNm dans les endosomes et déclencher une cascade inflammatoire. (

Figure 6) Les résultats de cette étude indiquent que l'ARNm circulaire est capable d'éviter la détection par les TLR et que l'évasion de TLR8 résulte de la conformation circulaire.

D'autres classes d'ARNm ont été développés : les ARNm non-réplicatifs (conventionnels) et les ARNm autoréplicatifs ou autoamplifiés (saRNA de l'anglais *self-amplifying RNA*). Ces deux types d'ARNm ont des propriétés biologiques différentes.

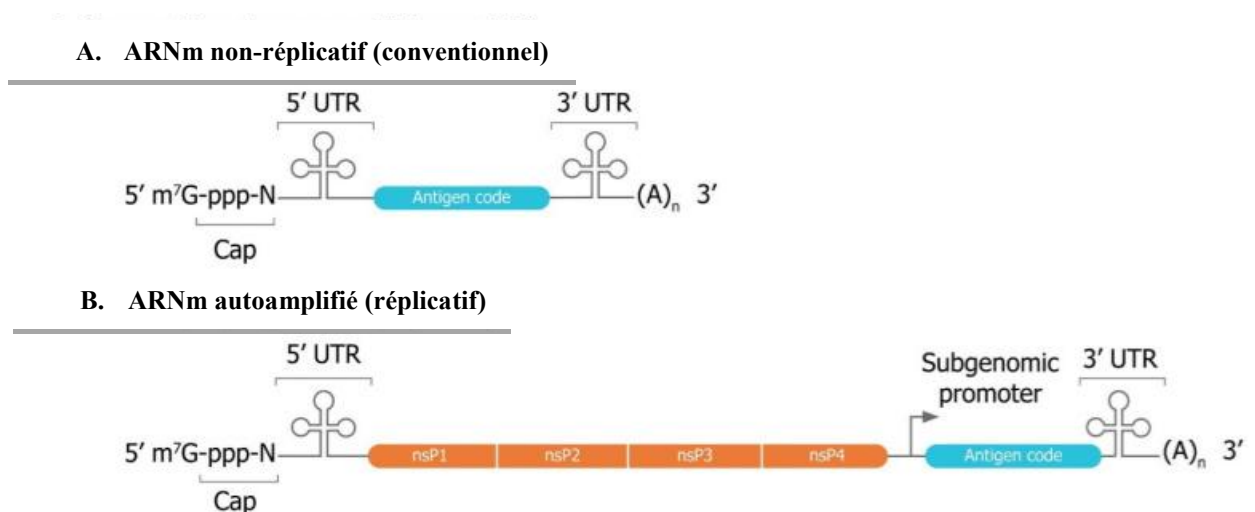


Figure 14. ARNm conventionnel vs ARNm autoamplifiés(109)

Figure 14 : Les ARNm conventionnels (A) et autoamplifiés (B) partagent des éléments de base, notamment une coiffe, un 5' UTR, un 3' UTR et une queue poly(A) de longueur variable. Les ARN autoamplifiés (saRNA) codent également quatre protéines non structurales (nsP1-4) et un promoteur sous-génomique dérivé du génome de l'alphavirus. Les nsP1-4 codent pour une réplicase responsable de l'amplification des saRNA qui permettent l'administration de doses plus faibles que les ARNm conventionnels (non réplicatifs).

L'ARNm autoréplicatif (saRNA) est basé sur l'utilisation du génome d'un autre virus à ARN positif, tel qu'un alphavirus ou un flavivirus, comme vecteur, et sur le prélèvement de l'ensemble des gènes qui codent pour les protéines non structurales (NS) et essentielles, y compris l'ARN polymérase ciblée par l'ARN (NS1), et l'élimination du reste pour le remplacer par la séquence génétique de la protéine/antigène à exprimer ; Il en résulte une molécule d'environ 9 kb de long, que l'on appelle un "réplicon". Après la répllication initiale du virus dans le cytoplasme, des fragments subgénomiques sont exprimés (grâce à l'insertion d'un promoteur) qui codent pour l'antigène désiré. De cette manière, le processus d'autorépllication

d'une seule molécule d'ARNm produit de grandes quantités d'antigène. Malgré l'utilisation de gènes d'autres virus, ils ne sont pas capables de former des particules viables et il n'y a aucun risque d'infection par ces virus.⁽¹¹⁰⁾

Ce caractère autorépliatif va nécessiter de plus faibles concentrations d' ARNm, et donc également de plus faibles quantités de nanoparticules lipidiques les contenant, induisant des effets indésirables moindres par rapport à l'ARNm classique (par exemple, une réponse puissante à l'interféron de type I déclenchée par un ARNm non purifié et non modifié peut induire une inflammation grave)⁽¹¹¹⁾ Cela réduirait également le coût de production des ARNm, en réduisant la quantité de matériaux nécessaires à leur fabrication.⁽¹⁰⁵⁾ Une étude a estimé la fabrication de 200,000 copies d'ARN à partir d'1 molécule d'ARN avec ce type de modèle auto-amplifiant.⁽¹¹²⁾ (*Figure 15*)

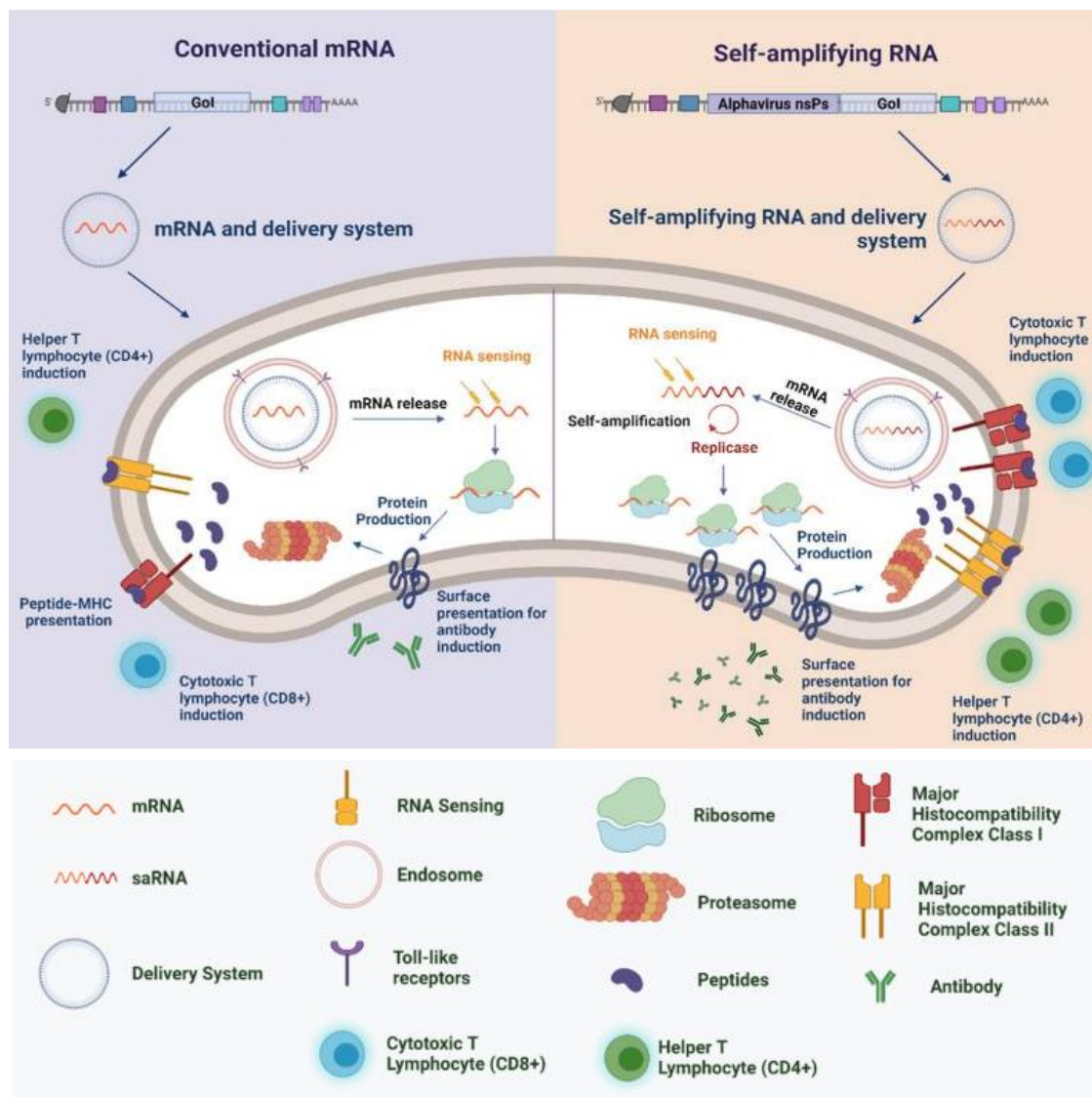


Figure 15. Représentation schématique des vaccins à base de saARNm d'après Machado et al. (105)

Figure 15 : Les ARNm répliatifs ont des propriétés biologiques différentes des ARNm conventionnels. Sur ce schéma on remarque la présence d'une séquence d'un alphavirus. L'ARNm autorépliatif (saRNA) tire parti de l'ensemble des gènes codant pour des virus non structuraux et des protéines essentielles, parmi lesquelles l'ARN polymérase dirigée par l'ARN (NSI). Le reste étant éliminé et remplacé par la séquence génétique de l'antigène à exprimer. Ce caractère autorépliatif va permettre une nécessité des concentrations plus faibles d'ARNm répliatifs, et donc de doses de vaccins efficaces plus faibles par rapport aux ARNm non-répliatifs

« RNA Sensing » : capteurs / senseurs d'ARN ; « mRNA and system delivery » : système de délivrance de l'ARNm ; surface presentation for antibody induction : présentation à la surface pour activation des anticorps ; « MHC » : complexe majeur d'histocompatibilité

La persistance de la protection vaccinale dans le temps est un facteur critique impactant l'efficacité de la protection vaccinale. Parmi les acteurs majeurs de l'immunité, on retrouve les lymphocytes T auxiliaire folliculaire (Tfh), qui pilotent les réponses d'anticorps à longue durée de vie et de haute affinité. Elles sont également nécessaires à la formation et au maintien des centres germinatifs (GC), qui constituent une partie importante de la réponse immunitaire humorale médiée par les lymphocytes B. Les centres germinatifs agissent en tant que centres de production et de maturation de l'affinité des cellules B mémoire à longue durée de vie et de génération d'immunoglobines (Ig) de grande affinité reconnaissant efficacement les agents infectieux.⁽¹¹³⁾

Le développement d'un vaccin à ARNm dont la réponse immunitaire induite fait intervenir les lymphocytes T auxiliaires folliculaire entraînerait une amélioration significative de l'efficacité du vaccin avec un prolongement de la durée d'action du vaccin. Une étude de Pardi *et al.*⁽¹¹⁴⁾ en 2018 a montré que la plateforme vaccinale « 1-méthylpseudouridine-ARNm-LNP » (*Figure 16*) a généré des niveaux élevés d'anticorps neutralisants contre le virus de la grippe, le ZIKV (virus Zika) et le VIH-1 chez la souris. Une seule immunisation a suffi pour générer des réponses d'anticorps protecteurs de classe et des titres d'anticorps qui ont augmentés pendant 8 semaines après l'immunisation et qui ont été maintenus pendant au moins 13 mois, indiquant de puissantes réactions des centres germinatifs. Ils ont démontré que l'ampleur des cellules T auxiliaire folliculaires et des lymphocytes B peut être un facteur critique déterminant l'efficacité de la plateforme 1-méthylpseudouridine(m1ψ)-ARNm-LNP par rapport à d'autres approches vaccinales.⁽¹¹⁴⁾

Le vaccin idéal pourrait être conservé à température ambiante avec une longue durée de conservation. Cependant, les vaccins couramment utilisés nécessitent au moins une conservation entre +2°C et +8°C.⁽¹¹⁵⁾ La thermosensibilité des vaccins peut être améliorée par les technologies de formulation. En effet, le pH de la solution, la force ionique, le potentiel redox ont également un impact sur la stabilité colloïdale de la suspension. En plus de l'optimisation de ces paramètres, nous pouvons ajouter des « stabilisateurs » comme l'arginine qui est couramment utilisé dans les formulations de protéines et qui empêche l'agrégation.

Pour les vaccins à ARNm qui se trouvent dans des véhicules lipidiques, la modification de surface des LNP peut stabiliser les particules. Par exemple : la PEGylation est couramment appliquée aux nanoparticules pour empêcher l'agrégation et améliorer leur pénétration à travers les membranes biologiques. (*Figure 10*) Les polyéthylènes glycols (PEGs) sont des molécules hydrosolubles qui vont fournir aux LPN une dispersion dans l'eau et une répulsion stérique.⁽¹¹⁶⁾ Des approches systématiques telles que le design par la qualité (ou QbD de l'anglais *Quality by Design*) sont souvent utilisées pour identifier les excipients importants ainsi que leur concentration dans les formulations vaccinales.⁽¹¹⁷⁾

Enfin, la lyophilisation des LNP, permettrait une conservation accrue des vaccins avec une meilleure thermosensibilité. En effet, des technologies sont disponibles pour transformer les vaccins liquides en poudre solide thermiquement stable. Étant donné que la COVID-19 est principalement une maladie respiratoire, l'établissement d'une protection immunitaire muqueuse est essentiel, ce qui indique que la vaccination muqueuse (intranasale, pulmonaire ou orale) pourrait être supérieure à la vaccination parentérale. Les modes d'administration de ces poudres tels que la voie intranasale ou pulmonaire est envisageable, à savoir qu'il existe déjà 3 vaccins antigrippaux intranasaux sur le marché, avec un bon profil de sécurité.⁽¹¹⁸⁾

Cependant, il subsiste de nombreux facteurs limitant ce mode d'administrations pour la vaccination à base d'ARNm. Des efforts doivent encore être faits et actuellement des chercheurs étudient les possibilités d'optimiser cette forme vaccinale en essayant de mieux comprendre l'induction des réponses immunitaires localisés, la pression du dispositif sur la formulation du vaccin etc.

L'administration du premier vaccin approuvé pour la prévention du COVID-19 (Cominarty®) a débuté au Royaume-Uni en décembre 2020. Dans les jours qui ont suivi son l'administration, des rapports ont fait état de trois réactions anaphylactiques survenues après la vaccination.⁽¹¹⁹⁾ Le même vaccin a ensuite reçu une autorisation d'utilisation d'urgence de la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis ⁽¹²⁰⁾ et, là aussi, au bout de quelques jours, on a signalé au moins deux réactions anaphylactiques.⁽¹²¹⁾

En général, les réactions anaphylactiques aux vaccins sont très rares, et se produisent à un taux d'environ 1 par million.⁽¹²²⁾ Ces rapports indiquent que le taux pourrait être plus élevé avec ces vaccins. L'anaphylaxie est un événement grave, potentiellement mortel, qui se produit en raison de la libération massive d'histamine et d'autres médiateurs par les granules des mastocytes. Elle est généralement déclenchée par un mécanisme médié par les IgE, par lequel une exposition préalable à un allergène chez une personne génétiquement prédisposée peut entraîner la production d'anticorps IgE spécifiques de l'allergène. Ces anticorps recouvrent ensuite la surface des mastocytes via récepteurs Fc-IgE³ de haute affinité. Lors d'une exposition ultérieure, l'allergène provoque la réticulation des IgE adjacents à la surface des mastocytes, ce qui entraîne une "dégranulation" et la libération de ces médiateurs dans les tissus locaux et la circulation.

Les réactions à une substance injectée, comme un vaccin, devraient se produire en quelques minutes. Les vaccins consistent en un ARNm modifié codant pour la protéine S à l'intérieur d'une LNP. La grande majorité des allergènes sont des protéines, et les vaccins ne contiennent aucune protéine. L'un des composants de la particule lipidique, le polyéthylèneglycol (PEG), a été signalé comme provoquant des réactions anaphylactiques à médiation IgE et est considéré comme un allergène coupable possible.⁽¹²³⁾ Le PEG est largement utilisé dans les médicaments oraux et injectables et les préparations intestinales, ainsi que dans des produits non médicaux tels que les cosmétiques et les aliments. Une telle exposition pourrait expliquer comment un patient peut être sensibilisé au PEG avant la vaccination par le COVID-19.

³Les récepteurs Fc : « *Fragment cristallisable* » sont des protéines transmembranaires présentes à la surface de cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ils se lient aux anticorps qui ont opsonisés les pathogènes. Leur activité stimule la destruction des pathogènes.

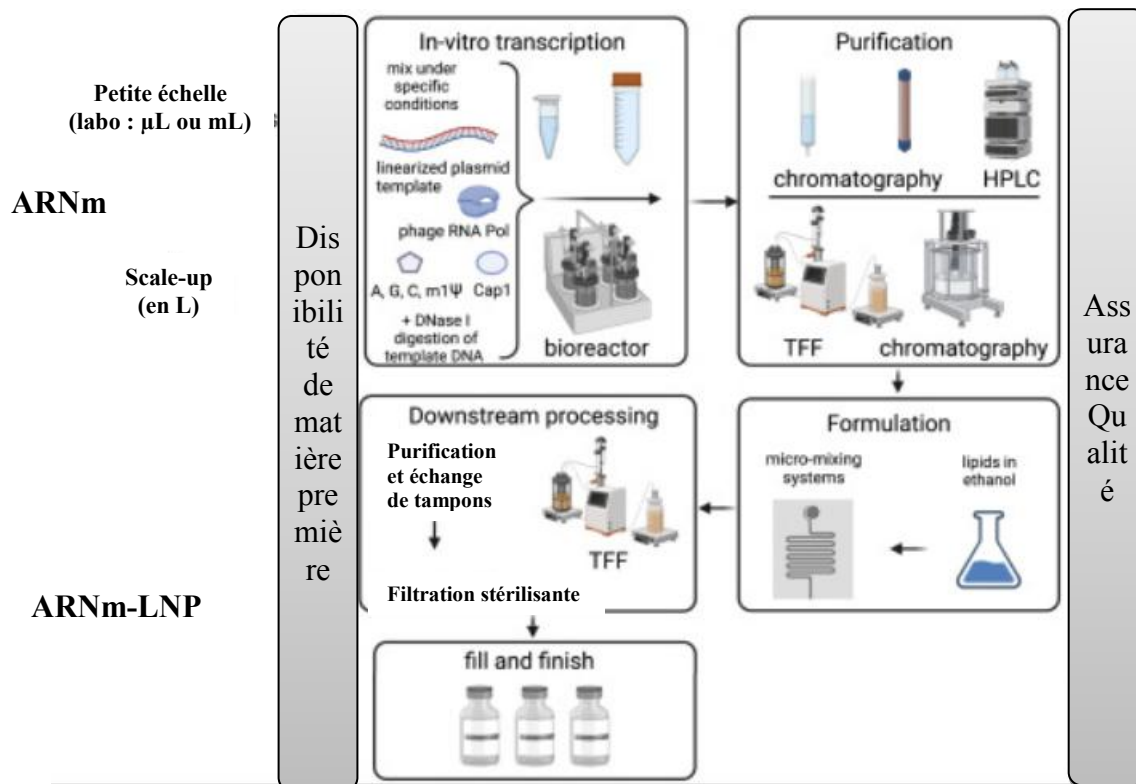


Figure 16. Fabrication et scale-up des vaccins à ARNm modifiés par des nucléosides(93)

Figure 16 : La première étape de la production de vaccins à ARNm modifié par des nucléosides consiste en une réaction *in vitro*. Cette réaction, repose sur le mélange d'une matrice plasmidique linéarisée, d'un ARN polymérase phagique, de nucléosides-triphosphates et de la structure Cap1 lorsqu'un processus de coiffage co-transcriptionnel est utilisé. La réaction *in vitro* peut être réalisée à différentes échelles et est généralement suivie d'une digestion par la DNase I. La purification de l'ARNm est un processus qui permet d'éliminer les sous-produits indésirables de la réaction *in vitro* et d'autres impuretés. L'épuisement de l'ARNm formé pendant les réactions *in vitro* par divers types de chromatographie, tels que les techniques HPLC ou filtration à flux tangentiel (TFF), signifie que les événements indésirables déclenchés par le vaccin ARNm, causés par les réponses du système immunitaire inné systémique, sont réduits au minimum. L'ARNm purifié est dilué dans une solution appropriée, puis formulé avec des composants lipidiques, qui sont dissous dans l'éthanol par une technologie de micro-mélange. Les processus en aval comprennent une purification supplémentaire, un échange de tampon et une filtration stérilisante avant le remplissage et la finition. La disponibilité des matières premières est d'une importance capitale pour une production continue à grande échelle lorsque la demande est élevée, comme lors d'une pandémie. Le processus est étroitement contrôlé par de nombreuses évaluations de la qualité du LNP, de l'ARNm et du LNP-ARNm.

Ces études ont été d'une grande importance dans l'établissement de points de référence pour une évaluation ultérieure et, par conséquent, dans l'aide au processus d'optimisation de ces vaccins, en assurant l'innocuité et l'immunogénicité essentielles, et en fournissant une base pour la production de vaccins à ARN conformément aux bonnes pratiques de fabrication.

Dans ce contexte, les innovations les plus importantes dans la technologie des vaccins à base d'ARN au cours des dernières années ont été orientées vers l'utilisation d'un séquençage optimisé de l'ARN, l'application de méthodes permettant une production cGMP (selon les bonnes pratiques de fabrications cliniques) à grande échelle et le développement de matériaux efficaces et sûrs pour l'administration de l'ARN.^(14,124)

Un schéma récapitulatif des différents types de vaccins à ARNm développés, du système de délivrance et du mécanisme d'action des vaccins anti-COVID-19 est représenté ci-dessous.

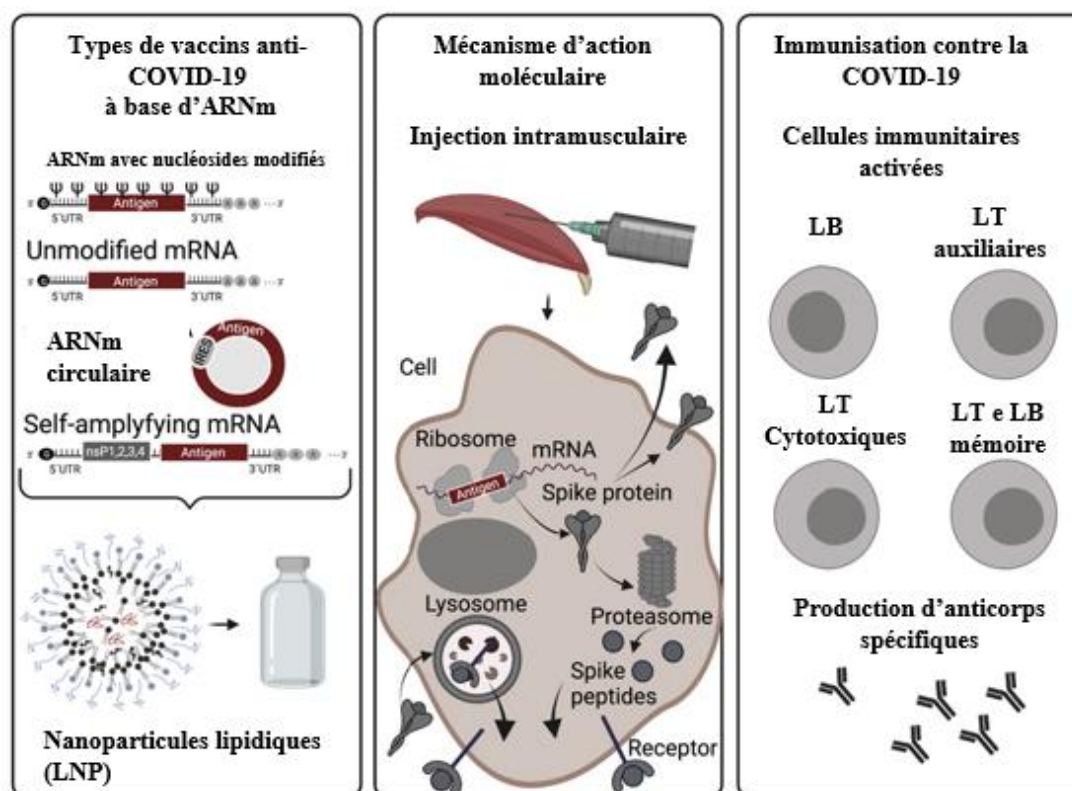


Figure 17. Schéma synthèse des types de vaccins à base d'ARNm et de leur mode d'action dans la COVID-19(93)

4 Elargissement des compétences vaccinales du pharmacien d'officine

Comme on a pu le voir précédemment, la pandémie de COVID-19 a suscité une très grande pression sur les activités de R&D et d'industrialisation pour trouver un traitement, mais l'état d'urgence sanitaire a également mobilisé les pharmaciens d'officines qui ont joué un rôle essentiel dans la gestion de cette crise sanitaire et dont les responsabilités dans le parcours de soin ont été fondamentales pour assurer le fonctionnement du pays. Toute la chaîne du médicament, partant de l'industrie pharmaceutique à l'officine de ville ou à la PUI (pharmacie à usage intérieur) a été challengée durant la crise sanitaire.

En France, compte tenu de la propagation du virus et du risque de saturation des hôpitaux et des services de soin (notamment en service de réanimation), l'état d'urgence sanitaire a été déployé. Par conséquent, la responsabilité du pharmacien d'officine a été importante.

Dans cette partie, nous vous présentons les rôles et responsabilités du pharmacien d'officine en France durant ces 2 dernières années. Nous aborderons le thème des vaccins à base d'ARNm, et le rôle des pharmaciens autour de cette thématique.

4.1 Prévention des risques infectieux

Au début de la crise sanitaire, la population mondiale n'avait aucun remède, aucune solution thérapeutique efficace face à ce virus émergent. Le confinement, les gestes barrières et préventions des risques infectieux étaient les seules solutions dont on disposait pour nous protéger contre ce virus, avant l'arrivée d'un traitement efficace et/ou d'un vaccin.

En tant que professionnels de santé, les pharmaciens étaient très impliqués dans la rédaction d'avis, d'élaboration de procédures d'hygiène en lien avec des sociétés savantes.

Des publications ont été réalisés grâce au Cespham (comité d'éducation sanitaire de la pharmacie Française), le but étant que les pharmaciens sensibilisent le grand public avec des informations scientifiques vérifiées, contrôlées et actualisées.⁽¹²⁵⁾ Les pharmaciens ont également produit des solutions hydroalcooliques, dispositif dérogatoire à leur cadre réglementaire. Des étudiants en pharmacie ont notamment été sollicité pour participer et alléger la charge de travail des pharmacies sous tension durant cette crise sanitaire. Il a également fallu anticiper les difficultés d'approvisionnements de masques (*Filtering Face Piece 2* [FFP2] et chirurgicaux).⁽¹²⁶⁾

4.2 Prescription et administration des vaccins

Alors que la politique vaccinale 2012-2017 plaçait le médecin traitant au centre du suivi vaccinal, depuis cette crise sanitaire, la collaboration des professionnels de santé a permis une meilleure couverture vaccinale. Pour améliorer l'accessibilité aux vaccins, les pharmaciens sont habilités à prescrire et à administrer les vaccins contre la COVID-19 depuis le 5 mars 2021 (à l'exception des femmes enceintes, patients présentant des troubles de l'hémostase, des personnes présentant des antécédents de réaction anaphylactique à l'un des composants de ces vaccins et à des personnes ayant présenté une réaction anaphylactique lors de la 1^{ère} dose).⁽¹²⁷⁾⁽¹²⁸⁾

Le décret n° 2021-248⁽¹²⁹⁾ autorisant les pharmaciens d'officine, des pharmacies mutualistes et de secours minières à prescrire et administrer tous les vaccins disponibles contre la Covid-19, qu'il soient à ARNm ou à vecteur viral, paru dans le journal officiel. Dans une recommandation diffusée le 2 mars, la haute autorité de santé (HAS) s'était prononcée en faveur de l'extension des compétences vaccinales des pharmaciens.⁽¹³⁰⁾

Dans ses recommandations de juillet 2018 relatives à l'extension des compétences du pharmacien d'officine, l'autorisation à la vaccination contre la grippe en faisait mention. Aujourd'hui les pharmaciens d'officine réalisent la double vaccination (contre la grippe et contre la COVID-19).

Avant de procéder à la vaccination, le pharmacien organise un entretien avec le patient durant lequel il doit s'assurer de l'absence de contre-indication. Le pharmacien doit ensuite installer le patient assis ou semi-allongé, il doit se laver les mains ou se les désinfecter grâce à une solution hydroalcoolique. Une désinfection locale cutanée au niveau du site d'injection doit être réalisée. L'administration du vaccin se fait par voie IM (intramusculaire) ou SC (sous cutanée profonde), au niveau du deltoïde moyen. Après l'injection, le patient doit rester sous surveillance pendant 10 à 15mn afin que le pharmacien puisse s'assurer que le patient ne fasse pas un choc anaphylactique (dans le cas contraire, le pharmacien procède à l'administration d'adrénaline en urgence).

Le pharmacien doit ensuite s'occuper de tracer la vaccination sur le carnet de santé, le carnet de vaccination ou le DMP (dossier médical partagé) toutes les informations relatives à l'acte de vaccination (nom, prénom du patient, date et heure de l'administration, nom du vaccin administré avec son n° de lot).

4.3 Transport, Stockage & Distribution

D'après la section B de l'ordre des pharmaciens : « Dans le cadre de leurs responsabilités de santé publique (articles R. 5124-36, R. 5124-48, R. 5121-23 et L. 5124-2 alinéa 2 du Code de la santé publique, Bonnes Pratiques de Fabrication et de Distribution), les établissements pharmaceutiques doivent respecter un haut niveau de qualité, depuis la fabrication des produits de santé, jusqu'à leur dispensation aux patients. En particulier, certains produits de santé doivent être conservés à 5°C +/- 3°C, au titre de leur Autorisation de Mise sur le Marché. Cette obligation s'impose depuis la fabrication du produit jusqu'à sa dispensation au patient, ce qui couvre donc le transport et définit la chaîne du froid.»⁽¹³¹⁾ Or, la contrainte de la chaîne du froid met en jeu la responsabilité du pharmacien (notamment lorsque le vaccin doit être conservé à une température de -70°C). Cette campagne de vaccination a été problématique, notamment pour le maintien de la chaîne de froid, avec des réfrigérateurs qui n'étaient pas adaptés aux conditions de conservation des vaccins qui exigeaient de s'approvisionner en réfrigérateurs onéreux avec une difficulté d'approvisionnement considérant le contexte d'alerte sanitaire. La problématique a été résolue grâce à un prolongement de la période de stockage à une température de 2 à 8°C des flacons par l'agence européenne du médicament (EMA) de 5 jours à 31 jours.

4.4 Actes de prévention

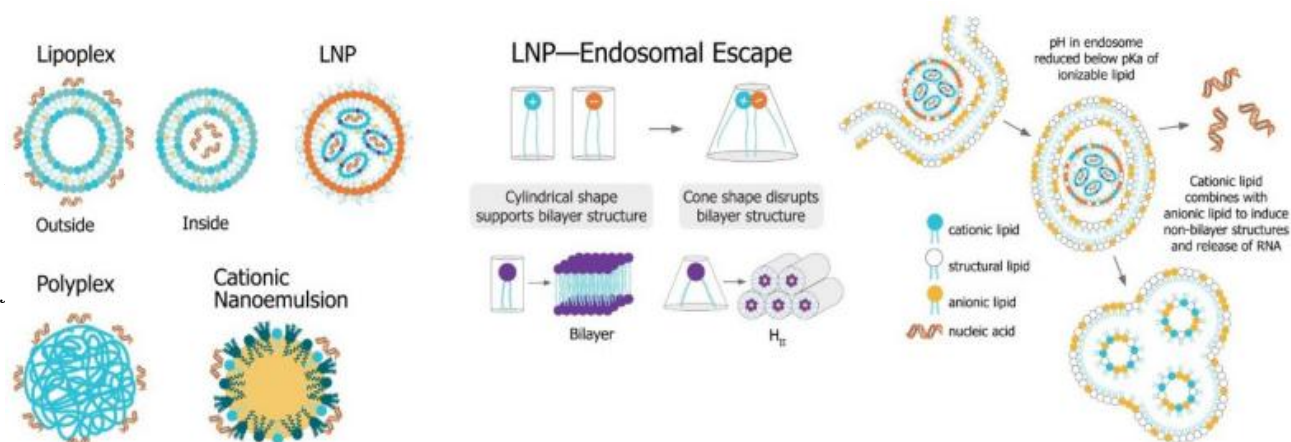
Les pharmaciens d'officines ont fortement contribué au suivi des cas de contaminations et du recensement quotidien de cas de COVID-19⁺ pendant la crise. Cette activité de dépistage impliquait la réalisation de tests antigéniques dès leur arrivée sur le marché. Mais au début de la crise (1^{ère} vague épidémique) ce sont les pharmaciens biologistes au sein de laboratoires qui étaient le plus sollicités et réalisaient des tests diagnostiques PCR (*polymerase chain reaction*) et de séquençage.⁽¹²⁶⁾ La stratégie gouvernementale a été de tester, tracer et isoler les patients positifs pendant une certaine durée, de contacter les « cas contacts » pour qu'ils se fassent tester à leur tour et ainsi limiter la chaîne de transmission du virus.

5 Perspectives d'optimisation des vaccins à base d'ARNm

L'un des principaux défis associés aux vaccins à base d'ARNm est lié au maintien de la réponse immunitaire dans le temps. Nous avons abordé les résultats issus des expériences sur des modèles animaux de vaccins à base d'ARNm développés par la plateforme « 1-méthylpseudouridine-ARNm-LNP » de Padi *et al* ⁽¹¹⁴⁾ et l'implication des lymphocytes Thf. Malgré des résultats prometteurs, ces optimisations étant encore en phase d'essais précliniques ou cliniques, il a fallu pallier ce problème dans le cadre de la pandémie actuelle avec des vaccins à ARNm déjà sur le marché qui représentent environ 43% des vaccins contre la COVID-19 (35% étaient des vaccins à virus entiers et 22% des vecteurs viraux).⁽¹³²⁾ De nombreuses études sur des populations ont suggéré la recommandation de rappels vaccinaux qui ont montré de très bons résultats concernant la durée de l'immunité (et notamment des anticorps neutralisants) après une 2^{ème} voire 3^{ème} dose du vaccin Cominarty®.^(133,134) De surcroît, l'apparition de nouveaux variants du virus est un réel défi qui exige une performance accrue de la réponse immunitaire des vaccins à ARNm. Ainsi, le développement de vaccins plus performants et qui protègent plus longtemps est requis pour l'optimisation de cette technologie à l'avenir.

La réponse immunitaire adaptative contre le coronavirus est de courte durée d'action. Cette nouvelle technologie utilise actuellement la méthode de production d'ARNm thérapeutiques *in vitro* qui nécessite d'être optimisée. Une optimisation de ce processus entraînera en parallèle, la diminution des coûts de production (qui dépendent principalement de la quantité de nanoparticules d'ARNm nécessaires par dose de vaccin et dans une moindre mesure, de l'échelle du processus de production)⁽¹³⁵⁾ Afin de répondre au mieux à la demande du marché mondial. Les vaccins à ARNm autoréplicatifs, en cours de développement clinique, permettraient de diminuer la dose nécessaire, et ainsi, satisfaire la demande mondiale en utilisant un processus de fabrication à moindre volume de travail en bioréacteur (échelle inférieure à 10L).⁽¹³⁵⁾ Par conséquent, peu de ressources seront nécessaires à la mise en place de ces processus à plus petite échelle. D'autre part, le développement de systèmes de délivrance performants est un élément clé au développement de ces vaccins à base d'ARNm. L'un des phénomènes étudiés que l'on a abordés est « la fuite (ou l'échappement) endosomale ». Celui-ci consiste en la libération de l'ARNm dans le cytosol afin qu'il soit traduit en protéine. Si ce phénomène de libération n'est pas contrôlé, l'efficacité du vaccin se

retrouvera impacté. Des études sur les systèmes de délivrance ont mis en avant l'utilisation de lipides cationiques ionisables sensibles au pH. (Figure 18)



pH ionise les lipides cationiques, qui interagissent alors de manière électrostatique avec les lipides anioniques de la membrane endosomale. Ces paires d'ions provoquent une transition de phase vers une phase hexagonale poreuse (HII) qui perturbe l'endosome et facilite la libération de l'ARN dans le cytoplasme.

De plus, un des défis majeurs des vaccins à ARNm durant cette crise a été la pénurie mondiale de composants essentiels tels que les nucléotides, les enzymes et les lipides. Par conséquent, il serait intéressant de songer à un processus de traitement en continu permettant le recyclage des consommables, une productivité améliorée et la facilité d'implémentation de technologies analytiques PAT (*process analytical technology*) qui amélioreraient le contrôle et la qualité du produit fini.⁽¹³⁶⁾ Les PAT sont une guideline réglementaire publiée par la FDA en septembre 2004, dont le but est de développer, analyser et contrôler les processus de production pharmaceutiques grâce aux mesures de d'attributs critique de qualité (ou cQA de l'anglais *critical Quality Attributes*) des matières premières et transformées pour assurer la qualité du produit final. Le but est donc d'améliorer l'efficacité du processus de fabrication en minimisant les déchets. Des guidelines réglementaires rédigées et en cours d'études sont mises à disposition par l'OMS⁽⁹⁵⁾. Ces lignes directrices concernent l'évaluation QSE (qualité, sécurité et efficacité) des vaccins à base d'ARNm. Il s'agit d'un document dynamique qui nécessite de constantes mises à jour aux vues de l'évolution du savoir concernant ces vaccins à travers le monde.

Grâce à la pandémie du COVID-19, les vaccins à base d'ARNm sont mis au-devant de la scène, et de plus en plus de scientifiques s'intéressent à mieux comprendre cette molécule pour en accroître le potentiel. L'investissement des chercheurs dans le monde, les bases de données et plateformes partagées ainsi que la vitesse de développement de nouvelles technologies sont à l'origine de nouvelles découvertes et d'une vitesse d'optimisation exceptionnelle dans ce domaine. En effet, plusieurs études sur les modifications structurales sont en cours pour mieux comprendre les rôles des composants de l'ARNm et de permettre une traduction améliorée. Par exemple, récemment Sample *et al.*⁽¹³⁷⁾ combinent le profilage du polysome d'une bibliothèque de 280 000 5' UTR aléatoires avec l'apprentissage profond pour construire un modèle prédictif qui relie la séquence 5' UTR humaine à la traduction. Avec un algorithme génétique, ils utilisent le modèle pour concevoir de nouveaux 5' UTR qui dirigent avec précision des niveaux spécifiés de chargement du ribosome, offrant ainsi la capacité de régler les séquences pour une expression optimale des protéines. Ils montrent que la même approche peut être étendue à l'ARNm modifié, une caractéristique importante pour les applications dans la thérapie de l'ARNm et la biologie synthétique. L'équipe de Sample *et al.* testent 35 000 5' UTR humains tronqués et 3 577 variants naturels et montrent que le modèle prédit le chargement du ribosome de ces séquences.⁽¹³⁷⁾

Concernant les rapports d'événements indésirables graves, les fabricants de vaccins et les organismes de réglementation enquêtent sur ces cas pour tenter de confirmer qu'il s'agissait bien d'événements anaphylactiques et d'en déterminer la cause. Ces enquêtes comprendront probablement la réalisation de tests cutanés d'allergie de type immédiat sur les patients ayant souffert de ces réactions apparentes ainsi que sur des sujets témoins. Si ces tests sont positifs chez les patients et négatifs chez les témoins, cela impliquerait un mécanisme médié par les IgE mais ne permettrait pas d'identifier l'allergène coupable. Des tests *in vitro* seraient également réalisés pour rechercher des IgE spécifiques sériques dirigées contre des composants spécifiques du vaccin.

Dans le cas de la pandémie de SARS-CoV-2, des inégalités en termes de vaccinations ont été observées à travers le monde, avec une disparité entre les pays développés et en cours de développement. En effet, si on considère que deux doses doivent être administrées par personne et que 70% de la population mondiale doit être vaccinée pour atteindre l'immunité collective, il faudrait dispenser 11 milliards de doses. Or, les pays à revenu faibles représentent 4/5^{ème} de la population mondiale et ont reçu moins de doses que les pays développés.⁽¹³²⁾ S'agissant d'une nouvelle technologie qui demande des matières premières

brevetées (ex. coiffes en 5', LNP) par certaines sociétés de biotechnologies, l'Afrique du Sud et l'Inde font partie des pays impliqués dans une campagne visant à obtenir la suppression des droits de propriété intellectuelle liés au COVID-19. Cette proposition s'est heurtée à l'opposition de l'union européenne, des États-Unis, du Royaume Uni et de la majorité des sociétés pharmaceutiques. En effet, d'un point de vue logistique, les droits de propriétés intellectuelles étant dispersés entre de nombreuses entreprises, la négociation peut prendre beaucoup de temps et ne permettrait pas de vacciner les populations peu développées plus rapidement.

Le directeur général de l'*International Vaccine Institute* à Séoul, Jérôme Kim, propose un transfert de technologie (TT), qui permettra d'accélérer le processus de fabrication avec d'avantages d'entreprises qui pourront produire les vaccins à base d'ARNm.

L'OMS préconise un « transfert de technologie coordonné », dans lequel les universités et les fabricants attribuent des licences pour leurs vaccins à d'autres entreprises, ce qui faciliterait également l'habilitation du personnel des entreprises bénéficiaires et coordonnerait les investissements dans les infrastructures. Un des continents les plus touchés par la disparité en termes de vaccins est l'Afrique, avec une population d'1,2 milliards d'habitants qui importe 99% de ses vaccins.⁽¹³²⁾ Victorieusement, le 18 Février 2022, l'OMS a révélé dans un communiqué de presse que six pays africains (Afrique du Sud, Égypte, Kenya, Nigéria, Sénégal et Tunisie), ont été sélectionnés pour héberger leur propre production de vaccins à ARNm en tant que premiers bénéficiaires d'un programme mondiale de l'OMS.⁽¹³⁸⁾

Des études sur les optimisations des vaccins à ARNm ont montré des résultats contradictoires. Notamment au sujet de l'utilisation de vaccins à ARNm circulaires visant à diminuer la reconnaissance des ARNm par le système immunitaire inné. En s'intéressant d'avantage aux méthodes utilisées dans ces études, il a été remarqué qu'elles n'utilisaient pas les mêmes procédés de traitement de purification. Or, la pureté étant un facteur critique dans l'immunogénicité des vaccins à ARNm, la qualité des résultats en dépend fortement. Ainsi, il est important de garder un regard critique sur les articles et de s'assurer que les méthodes utilisées correspondent aux recommandations ou d'évaluer la comparabilité des méthodes expérimentales pour déterminer la provenance d'incohérence entre deux ou plusieurs études.

Conclusion

Dans le cadre de la crise sanitaire de la Covid-19, les premiers vaccins à base d'ARNm utilisés en médecine humaine ont été autorisés. Afin d'être mis sur le marché rapidement, les phases de développement des vaccins contre la Covid-19 ont été accélérées. Cela a été permis grâce à plusieurs facteurs : le séquençage très rapide du virus, les recherches antérieures et une collaboration accrue avec les autorités.

Peut-on postuler que les vaccins à base d'ARNm sont les vaccins du futur ?

Les plateformes des vaccins à ARNm ont fait leur preuve dans le domaine de la vaccinologie. Leur capacité de production rapide, sûre et efficace ont montré qu'ils sont des armes thérapeutiques majeures face à l'apparition de pandémies. L'un des avantages cruciaux de ces vaccins est leur rapidité et facilité de production. En effet, l'ARN peut être produit dans un environnement sans cellules, par transcription *in vitro*, ce qui facilite et accélère leur procédé de fabrication. Cependant, nous avons vu que des limites/défis à leur développement existent : stabilité thermique, stabilité après l'injection (système immunitaire inné et nucléases), mode d'action de courte durée et capacité de traduction limitée.

Ainsi, de nombreuses optimisations portant sur l'amélioration des procédés de fabrication et de purification ont été réalisés. On retrouve notamment des modifications structurales tels que le remplacement de nucléotides modifiés, la vectorisation des molécules d'ARNm ou encore le développement d'ARN autorépliquatifs, qui ont permis une nette amélioration de la capacité traductionnelle de l'antigène d'intérêt, avec une réponse immunitaire optimisée. Des études ont démontré que selon l'indication, un mode d'administration spécifique et localisé (ex. intranasale ou intrapulmonaire⁽¹³⁹⁾) pourrait améliorer l'efficacité vaccinale. L'utilisation de véhicules à base de LNP PEGylés permet la protection des molécules d'ARNm contre les ribonucléases et les récepteurs du système immunitaire (TLR et PRR). Par ailleurs, des progrès sont en cours concernant la lyophilisation des vaccins à base d'ARNm pour améliorer leur stabilité thermique et faciliter leur transport et conditions de stockage.

Aux vues du potentiel de ces plateformes à ARNm, de leurs polyvalences en termes d'implications thérapeutiques et grâce au succès des vaccins contre la COVID-19, cette technologie suscite l'intérêt des laboratoires pharmaceutiques. En effet, celles-ci investissent

dans l'ARNm et se lancent dans l'acquisition de biotech spécialisées dans cette technologie. Par exemple, Sanofi (société pharmaceutique Française faisant partie des leader pharmaceutiques mondiaux) a racheté Tidal Therapeutics avant d'acquérir la totalité des actions de Translate Bio pour plus de 2 milliards d'euros. Cet intérêt suggère que ce domaine est en pleine expansion et que de nombreux développements sont à prévoir.

Cette thèse était centrée sur les vaccins anti-COVID-19, pour cause, il s'agit du 1^{er} vaccin à base d'ARNm ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) et pour lequel on dispose de beaucoup de données. L'optimisation des vaccins a permis par l'apparition de la pandémie a suscité l'application de ces procédés à d'autres domaines d'intérêts thérapeutiques majeurs tels que le VIH. En janvier 2022, dans un communiqué de presse, Moderna a annoncé qu'un premier patient avait reçu une dose du vaccin à base d'ARNm contre le VIH dans un essai clinique de phase I. Les résultats sont attendus pour 2023. Le VIH est une maladie pour laquelle aucun schéma vaccinal n'a été développé jusqu'à l'utilisation des vaccins à base d'ARNm. Cet exemple illustre encore une fois l'idée que cette technologie est porteuse d'espoir et cela, dans différentes pathologies.

D'après Stephen Hoge, président de Moderna :

« La technologie d'ARNm est une « opportunité » car jusqu'à présent, il a été impossible de développer un schéma vaccinal chez l'Homme induisant des niveaux de protection durable en anticorps neutralisants contre le VIH ».

Références Bibliographiques

1. Sankaran N. The RNA World at Thirty: A Look Back with its Author. *J Mol Evol.* 1 déc 2016;83(5):169- 75.
2. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science.* 17 juin 2016;352(6292):1413- 6.
3. Vignes M. Modèles markoviens graphiques pour la fusion de données individuelles et d'interactions : application à la classification de gènes. 27 août 2022;
4. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 29 août 1986;46(5):659- 67.
5. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 1 mai 2007;23(5):243- 9.
6. tatum-edward.pdf [Internet]. [cité 18 avr 2022]. Disponible sur: <http://www.nasonline.org/publications/biographical-memoirs/memoir-pdfs/tatum-edward.pdf>
7. Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based Therapeutics- Current Progress and Future Prospects. *Chem Biol.* 27 janv 2012;19(1):60- 71.
8. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood.* 24 avr 2014;123(17):2625- 35.
9. Barrett DM, Liu X, Jiang S, June CH, Grupp SA, Zhao Y. Regimen-Specific Effects of RNA-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells in Mice with Advanced Leukemia. *Hum Gene Ther.* août 2013;24(8):717- 27.
10. University of Pennsylvania. Phase I Clinical Trial of Autologous Mesothelin Re-directed T Cells in Patients With Chemotherapy Refractory Metastatic Pancreatic Cancer [Internet]. clinicaltrials.gov; 2017 sept [cité 14 avr 2022]. Report No.: NCT01897415. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01897415>
11. Les cellules CAR-T [Internet]. Gustave Roussy. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: <https://www.gustaveroussy.fr/fr/les-cellules-car-t>
12. Krienke C, Kolb L, Diken E, Streuber M, Kirchhoff S, Bukur T, et al. A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 8 janv 2021;371(6525):145- 53.
13. Scheibelhofer S, Thalhamer J, Weiss R. DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatr Allergy Immunol.* nov 2018;29(7):679- 88.
14. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* avr 2018;17(4):261- 79.
15. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med.* oct 2015;278(4):369- 95.
16. Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, Rosenblum D, Dammes N, Kedmi R, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat Commun.* 29 oct 2018;9(1):4493.
17. Curin M, Khaitov M, Karaulov A, Namazova-Baranova L, Campana R, Garib V, et al. Next-Generation of Allergen-Specific Immunotherapies: Molecular Approaches. *Curr Allergy Asthma Rep.* 9 juin 2018;18(7):39.
18. Barnes PJ. Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature.* 25 nov 1999;402(6760 Suppl):B31-38.
19. Linhart B, Valenta R. Vaccines for allergy. *Curr Opin Immunol.* juin 2012;24(3):354- 60.
20. Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, Fruehwirth A, Stoecklinger A, Mostböck S, et al. Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2009;124(5):1070-1077.e1-11.

21. Hattinger E, Scheiblhofer S, Roesler E, Thalhamer T, Thalhamer J, Weiss R. Prophylactic mRNA Vaccination against Allergy Confers Long-Term Memory Responses and Persistent Protection in Mice. *J Immunol Res.* 2015;2015:797421.
22. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* févr 2014;14(2):135- 46.
23. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *Int J Mol Sci.* 9 sept 2020;21(18):E6582.
24. Weide B, Carralot JP, Reese A, Scheel B, Eigentler TK, Hoerr I, et al. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. mars 2008;31(2):180- 8.
25. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. juin 2009;32(5):498- 507.
26. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther.* 10 avr 2019;27(4):710- 28.
27. Wilgenhof S, Van Nuffel AMT, Corthals J, Heirman C, Tuyaerts S, Benteyn D, et al. Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. juin 2011;34(5):448- 56.
28. 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.* 1 août 1996;184(2):465- 72.
29. Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev.* juin 2004;199:251- 63.
30. Yanagisawa R, Koizumi T, Koya T, Sano K, Kido S, Nagai K, et al. WT1-pulsed Dendritic Cell Vaccine Combined with Chemotherapy for Resected Pancreatic Cancer in a Phase I Study. *Anticancer Res.* avr 2018;38(4):2217- 25.
31. Bol KF, Figdor CG, Aarntzen EH, Welzen ME, van Rossum MM, Blokx WA, et al. Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology.* août 2015;4(8):e1019197.
32. Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther.* avr 2021;28(3- 4):117- 29.
33. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Design Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. *Nature.* oct 2020;586(7830):567- 71.
34. Zhong Z, Portela Catani JP, Mc Cafferty S, Couck L, Van Den Broeck W, Gorlé N, et al. Immunogenicity and Protection Efficacy of a Naked Self-Replicating mRNA-Based Zika Virus Vaccine. *Vaccines.* 23 août 2019;7(3):E96.
35. Aldrich C, Leroux-Roels I, Huang KB, Bica MA, Loeliger E, Schoenborn-Kellenberger O, et al. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine.* 22 févr 2021;39(8):1310- 8.
36. Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, Ramanathan P, Ciaramella G, Bukreyev A. Modified mRNA-Based Vaccines Elicit Robust Immune Responses and Protect Guinea Pigs From Ebola Virus Disease. *J Infect Dis.* 17 janv 2018;217(3):451- 5.
37. Egan KP, Hook LM, Naughton A, Pardi N, Awasthi S, Cohen GH, et al. An HSV-2 nucleoside-modified mRNA genital herpes vaccine containing glycoproteins gC, gD, and gE protects mice against HSV-1 genital lesions and latent infection. *PLoS Pathog.* juill 2020;16(7):e1008795.

38. Nelson CS, Jenks JA, Pardi N, Goodwin M, Roark H, Edwards W, et al. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Nucleoside-Modified mRNA Vaccine Elicits Antibody Responses with Greater Durability and Breadth than MF59-Adjuvanted gB Protein Immunization. *J Virol*. 16 avr 2020;94(9):e00186-20.
39. D'haese S, Lacroix C, Garcia F, Plana M, Ruta S, Vanham G, et al. Off the beaten path: Novel mRNA-nanoformulations for therapeutic vaccination against HIV. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 févr 2021;330:1016- 33.
40. Fleeton MN, Chen M, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Murphy M, et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis*. 1 mai 2001;183(9):1395- 8.
41. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*. déc 2012;30(12):1210- 6.
42. Rosa SS, Prazeres DMF, Azevedo AM, Marques MPC. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*. 15 avr 2021;39(16):2190- 200.
43. Wei CJ, Crank MC, Shiver J, Graham BS, Mascola JR, Nabel GJ. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2020;19(4):239- 52.
44. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo [Internet]. [cité 18 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1690918>
45. Covid-19 – Comment marchent les vaccins à ARN ? [Internet]. [cité 27 août 2022]. Disponible sur: <https://www.quechoisir.org/decryptage-covid-19-comment-marchent-les-vaccins-a-arn-n88598/>
46. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science*. 19 mars 1993;259(5102):1745- 9.
47. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci*. 13 avr 1999;96(8):4262- 7.
48. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*. mars 2017;543(7644):248- 51.
49. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(8):2428- 37.
50. Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Le monde complexe et mouvant des ARN. Première partie. *Immuno-Anal Biol Spéc*. 1 févr 2010;25(1):4- 25.
51. L'expression du patrimoine génétique - 1S - Cours SVT - Kartable [Internet]. [cité 27 août 2022]. Disponible sur: <https://www.kartable.fr/ressources/svt/cours/lexpression-du-patrimoine-genetique/19013>
52. Nucleic acid driven sterile inflammation - ScienceDirect [Internet]. [cité 8 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661613000041>
53. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 1 févr 2015;15(2):87- 103.
54. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. juill 2007;5(7):396- 7.
55. Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, Verrier B. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. *Trends Mol Med*. 1 mars 2020;26(3):311- 23.
56. Pulit-Penalosa JA, Scherbik SV, Brinton MA. Activation of Oas1a gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for Oas1b activation. *Virology*. 10 avr 2012;425(2):71- 81.

57. Pollard C, Rejman J, De Haes W, Verrier B, Van Gulck E, Naessens T, et al. Type I IFN Counteracts the Induction of Antigen-Specific Immune Responses by Lipid-Based Delivery of mRNA Vaccines. *Mol Ther*. 1 janv 2013;21(1):251- 9.
58. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, et al. The Specific and Essential Role of MAVS in Antiviral Innate Immune Responses. *Immunity*. 1 mai 2006;24(5):633- 42.
59. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/nar/article/39/21/e142/1104771?login=true>
60. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1132505>
61. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/nar/article/42/5/3228/1060959?login=true>
62. N. Kuhn A, Beißert T, Simon P, Vallazza B, Buck J, P. Davies B, et al. mRNA as a Versatile Tool for Exogenous Protein Expression. *Curr Gene Ther*. 1 oct 2012;12(5):347- 61.
63. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening | *Elsevier Enhanced Reader* [Internet]. [cité 14 mai 2022]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1525001618305951?token=0B2D02A46315BBD02BDB03ACDB4DA8E11F32391F3098C7F69D8C626DC6EF7E1DF63F75BEB3302084BE793142E6BCC5BB&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220514141549>
64. Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, Chen YH, Yee BA, Yeo GW, et al. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2017;24(12):1057- 63.
65. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*. 15 déc 2006;108(13):4009- 17.
66. Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, Henderson JM, Hendel A, Shore S, et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 7 sept 2018;12:530- 42.
67. Mu X, Greenwald E, Ahmad S, Hur S. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Res*. 1 juin 2018;46(10):5239- 49.
68. Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, et al. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 15 avr 2019;15:26- 35.
69. 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*. 1 août 2005;23(2):165- 75.
70. CleanCap mRNA Capping Technology | TriLink Biotechnologies | TriLink BioTechnologies [Internet]. [cité 28 août 2022]. Disponible sur: <https://www.trilinkbiotech.com/cleancap>
71. Kaczmarek JC, Kowalski PS, Anderson DG. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med*. 27 juin 2017;9(1):60.
72. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2018;19(5):281- 96.
73. Honig BH, Hubbell WL, Flewelling RF. Electrostatic Interactions in Membranes and Proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1986;15(1):163- 93.

74. Houseley J, Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*. 20 févr 2009;136(4):763- 76.
75. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett*. 11 nov 2015;15(11):7300- 6.
76. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*. 2012;1:27.
77. Gene-therapy trials must proceed with caution. *Nature*. 30 juin 2016;534(7609):590.
78. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*. févr 2010;28(2):172- 6.
79. Junquera E, Aicart E. Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors. *Adv Colloid Interface Sci*. juill 2016;233:161- 75.
80. Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, Wallin S, Wu X, J.Kvist A, et al. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*. 10 avr 2018;115(15):E3351- 60.
81. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol*. sept 2015;33(9):941- 51.
82. Rehman Z ur, Hoekstra D, Zuhorn IS. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano*. 28 mai 2013;7(5):3767- 77.
83. Martens TF, Remaut K, Demeester J, De Smedt SC, Braeckmans K. Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. *Nano Today*. 1 juin 2014;9(3):344- 64.
84. Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14(1):1- 16.
85. Watanabe J, Kotera H, Akashi M. Reflexive Interfaces of Poly(trimethylene carbonate)-Based Polymers: Enzymatic Degradation and Selective Adsorption. *Macromolecules*. 1 nov 2007;40(24):8731- 6.
86. Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 juill 2005;102(27):9469- 74.
87. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 2009;21:419- 24.
88. De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S. Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines. *Trends Mol Med*. 1 mars 2017;23(3):216- 26.
89. Kranz LM, Diken M, Haas H, Kreiter S, Loquai C, Reuter KC, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*. juin 2016;534(7607):396- 401.
90. Heesen L, Jabulowsky R, Loquai C, Utikal J, Gebhardt C, Hassel J, et al. A first-in-human phase I/II clinical trial assessing novel mRNA-lipoplex nanoparticles encoding shared tumor antigens for potent melanoma immunotherapy. *Ann Oncol*. 1 déc 2017;28:xi14- 5.
91. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1557- 66.
92. Sahin U, Muik A, Vogler I, Derhovanessian E, Kranz LM, Vormehr M, et al. BNT162b2 induces SARS-CoV-2-neutralising antibodies and T cells in humans [Internet]. *medRxiv*; 2020 [cité 20 mai 2022]. p. 2020.12.09.20245175. Disponible sur: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.09.20245175v1>
93. Szabó GT, Mahiny AJ, Vlatkovic I. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments. *Mol Ther*. 4 mai 2022;30(5):1850- 68.

94. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 [cité 21 mai 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.587269>
95. considerations-who-evaluation-of-covid-vaccine_v25_11_2020.pdf [Internet]. [cité 20 mai 2022]. Disponible sur: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/in-vitro-diagnostics/covid19/considerations-who-evaluation-of-covid-vaccine_v25_11_2020.pdf?sfvrsn=f14bc2b1_3&download=true
96. Sophie T. Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2. 2020;135.
97. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 20 févr 2020;382(8):727- 33.
98. Okada P, Buathong R, Phuygun S, Thanadachakul T, Parnmen S, Wongboot W, et al. Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Eurosurveillance*. 27 févr 2020;25(8):2000097.
99. Re3data.Org. GISAID. 2012 [cité 29 août 2022]; Disponible sur: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126>
100. The story behind COVID-19 vaccines [Internet]. [cité 20 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abi8397>
101. Zhang NN, Li XF, Deng YQ, Zhao H, Huang YJ, Yang G, et al. A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell*. 3 sept 2020;182(5):1271-1283.e16.
102. comirnaty-epar-product-information_en.pdf [Internet]. [cité 20 mai 2022]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_en.pdf
103. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med*. 17 déc 2020;383(25):2439- 50.
104. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs*. 1 mars 2021;81(4):495- 501.
105. Machado BAS, Hodel KVS, Fonseca LM dos S, Mascarenhas LAB, Andrade LPC da S, Rocha VPC, et al. The Importance of RNA-Based Vaccines in the Fight against COVID-19: An Overview. *Vaccines*. 17 nov 2021;9(11):1345.
106. Wang J, Peng Y, Xu H, Cui Z, Williams RO. The COVID-19 Vaccine Race: Challenges and Opportunities in Vaccine Formulation. *AAPS PharmSciTech*. 5 août 2020;21(6):225.
107. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol Ther*. 1 nov 2008;16(11):1833- 40.
108. Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Parker-Hale FC, Huang Y, Bisaria N, Anderson DG. RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. *Mol Cell*. 2 mai 2019;74(3):508-520.e4.
109. Blakney AK, Ip S, Geall AJ. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. *Vaccines*. 28 janv 2021;9(2):97.
110. Reina J. La nueva generación de vacunas de ARN mensajero (ARNm) frente a la gripe. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 27 août 2021 [cité 20 mai 2022]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8397276/>
111. Scorza FB, Pardi N. New Kids on the Block: RNA-Based Influenza Virus Vaccines. *Vaccines*. 1 avr 2018;6(2):20.
112. Lundstrom K. Self-Amplifying RNA Viruses as RNA Vaccines. *Int J Mol Sci*. 20 juill 2020;21(14):5130.

113. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):429- 57.
114. Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, Parkhouse K, Cain DW, Jones L, et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J Exp Med*. 8 mai 2018;215(6):1571- 88.
115. World Health Organization. Temperature sensitivity of vaccines [Internet]. World Health Organization; 2006 [cité 20 mai 2022]. Report No.: WHO/IVB/06.10. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69387>
116. Acar HY ci, Garaas RS, Syud F, Bonitatebus P, Kulkarni AM. Superparamagnetic nanoparticles stabilized by polymerized PEGylated coatings. *J Magn Magn Mater*. 1 mai 2005;293(1):1- 7.
117. Une approche rationnelle et systématique pour le développement de formulations de vaccins | SpringerLink [Internet]. [cité 20 mai 2022]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-011-9261-1>
118. Kulkarni PS, Raut SK, Dhere RM. A post-marketing surveillance study of a human live-virus pandemic influenza A (H1N1) vaccine (Nasovac (®)) in India. *Hum Vaccines Immunother*. janv 2013;9(1):122- 4.
119. The U.K. says people with severe allergies should not take the Pfizer-BioNTech vaccine while two reactions are under investigation. - The New York Times [Internet]. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: <https://www.nytimes.com/2020/12/09/world/the-uk-says-people-with-severe-allergies-should-not-take-the-pfizer-biontech-vaccine-while-two-reactions-are-under-investigation.html>
120. Regev-Yochay G, Gonen T, Gilboa M, Mandelboim M, Indenbaum V, Amit S, et al. Efficacy of a Fourth Dose of Covid-19 mRNA Vaccine against Omicron. *N Engl J Med*. 7 avr 2022;386(14):1377- 80.
121. Weiland N, LaFraniere S, Baker M, Thomas K. 2 Alaska Health Workers Got Emergency Treatment After Receiving Pfizer's Vaccine. The New York Times [Internet]. 16 déc 2020 [cité 30 août 2022]; Disponible sur: <https://www.nytimes.com/2020/12/16/health/covid-pfizer-vaccine-allergic-reaction.html>
122. McNeil MM, Weintraub ES, Duffy J, Sukumaran L, Jacobsen SJ, Klein NP, et al. Risk of anaphylaxis after vaccination in children and adults. *J Allergy Clin Immunol*. mars 2016;137(3):868- 78.
123. Wenande E, Garvey LH. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. juill 2016;46(7):907- 22.
124. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*. août 2020;65:14- 20.
125. Cespharm - Coronavirus : informations et recommandations pour les professionnels de santé [Internet]. [cité 21 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.cespharm.fr/prevention-sante/actualites/2022/coronavirus-informations-et-recommandations-pour-les-professionnels-de-sante>
126. Éthique et déontologie pharmaceutiques face à la crise sanitaire COVID-19 | Lecteur amélioré Elsevier [Internet]. [cité 21 mai 2022]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1279847921000987?token=227EAC2594193AFA26A9B1589139263687D4AC3C4346EF37D4F0D35FC06386E0ADF46F2321447847472AC601E29EA371&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220520221206>
127. Piraux A, Cavillon M, Ramond-Roquin A, Faure S. Assessment of Satisfaction with Pharmacist-Administered COVID-19 Vaccinations in France: PharmaCoVax. *Vaccines*. mars 2022;10(3):440.
128. Les pharmaciens d'officine autorisés à prescrire et à administrer les vaccins contre la Covid-19 - Communications - Ordre National des Pharmaciens [Internet]. [cité 21 mai 2022].

Disponible sur: <http://www.ordre.pharmacien.fr/Communications/Les-actualites/Les-pharmaciens-d-officine-autorises-a-prescrire-et-a-administrer-les-vaccins-contre-la-Covid-19> 129. Décret n° 2021-248 du 4 mars 2021 modifiant les décrets n° 2020-1262 du 16 octobre 2020 et n° 2020-1310 du 29 octobre 2020 prescrivant les mesures générales nécessaires pour faire face à l'épidémie de covid-19 dans le cadre de l'état d'urgence sanitaire - Légifrance [Internet]. [cité 29 août 2022]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043216584>

130. Stratégie de vaccination contre le SARS-CoV-2 - Extension des compétences vaccinales des professionnels de santé [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 29 août 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3240075/fr/strategie-de-vaccination-contre-le-sars-cov-2-extension-des-competences-vaccinales-des-professionnels-de-sante

131. Recommandations relatives au transport des produits de santé (5°C +/- 3°C) - Communications - Ordre National des Pharmaciens [Internet]. [cité 21 mai 2022]. Disponible sur: <http://www.ordre.pharmacien.fr/Communications/Publications-ordinales/Recommandations-relatives-au-transport-des-produits-de-sante-5-C-3-C>

132. Irwin A. What it will take to vaccinate the world against COVID-19. *Nature*. 25 mars 2021;592(7853):176- 8.

133. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, Olagne J, Cognard N, Fafi-Kremer S, et al. Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal Serologic Response to 2 Doses. *JAMA*. 23 juill 2021;

134. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months | *NEJM* [Internet]. [cité 22 mai 2022]. Disponible sur:

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NeJMoa2110345>

135. Kis Z, Kontoravdi C, Shattock R, Shah N. Resources, Production Scales and Time Required for Producing RNA Vaccines for the Global Pandemic Demand. *Vaccines*. 23 déc 2020;9(1):3.

136. Kapoor Y, Meyer RF, Meyer BK, DiNunzio JC, Bhambhani A, Stanbro J, et al. Flexible Manufacturing: The Future State of Drug Product Development and Commercialization in the Pharmaceutical Industry. *J Pharm Innov*. 1 mars 2021;16(1):2- 10.

137. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen I, Morris DR, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nat Biotechnol*. juill 2019;37(7):803- 9.

138. Six pays africains auront leur propre unité de production de vaccin ARNm – OMS [Internet]. ONU Info. 2022 [cité 22 mai 2022]. Disponible sur: <https://news.un.org/fr/story/2022/02/1114632>

139. Le candidat-vaccin à ARNm contre la COVID-19 de Sanofi et Translate Bio a induit la production de concentrations élevées d'anticorps dans le cadre d'études précliniques - Sanofi [Internet]. [cité 1 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.sanofi.com/fr/media-room/communiqués-de-presse/2020/2020-10-15-12-00-00-2109121>

Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

Prénom étudiant : Akram
Nom étudiant : Berkani

Nom – Prénoms : Berkani Akram

Titre de la Thèse : L'optimisation des vaccins à ARNm

Résumé de la thèse :

Etudiés depuis une dizaine d'années, les vaccins à ARNm ont montré plusieurs avantages tels que leur coût et leur mode de production qui nécessite moins de contrôles et de temps comparés aux vaccins conventionnels. Leur mode d'action repose sur une réponse immunitaire innée, témoignant d'un caractère auto-adjuvant et d'une réponse immunitaire efficace. En plus de ne pas nécessiter d'adjuvants, ce type de vaccin est non infectieux et non intégratif, ce qui en améliore la sécurité d'emploi. Le type de réponse immunitaire cellulaire dépend fortement du type d'immunogène utilisé. Ils induisent une réponse immunitaire vaccinale conduisant à la production d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire de type Th1. Ce nouveau mode de vaccination comporte encore des limites et défis, tels que leur condition de stockage, leur sensibilité aux ribonucléases, leur capacité à être reconnu par le système immunitaire inné, leur mode d'action de courte durée, leur capacité de traduction limitée, et, dans un contexte pandémique, les pénuries de matières premières.

Ce travail fait un état de l'art des recherches effectuées à ce jour afin d'optimiser les vaccins à ARNm. L'optimisation des vaccins à base d'ARNm fait référence aux travaux de recherches permettant l'amélioration de leur efficacité et de leur développement. C'est notamment grâce aux innovations, aux progrès technologiques, ainsi qu'à une compréhension accrue de leur mécanisme d'action, que le développement de vaccins à base d'ARNm à l'origine d'une réponse immunitaire sûre, efficace et durable chez la population vaccinée deviendra possible.

MOTS CLÉS

ARNm, VACCIN, COVID-19, OPTIMISATION, LNP, INTERFERON

JURY :

PRÉSIDENT : Mr Jean Michel Robert, Professeur de Chimie Médicinale & Drug Discovery, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

ASSEESSEURS : Mme Sophie Fougeray, Maître de conférences en Immunologie et de Biotechnologies, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Mme Latifa Vidal, Maître de conférences en Pharmacocinétique, Pharmacologie et imagerie préclinique, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes
