

2023-2024

**Thèse**

pour le

**Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

**ARNm : NOUVEAU CANDIDAT  
MEDICAMENT POUR LA PRISE EN  
CHARGE DE DIVERSES PATHOLOGIES.**

--

**mRNA : A NEW DRUG CANDIDATE FOR  
THE TREATMENT OF VARIOUS  
DISEASES.**

**Sandadi Marine**

Née le 21 avril 1999 à Château-Gontier (53)

Sous la direction du Professeur Clere Nicolas

Membres du jury

MARCHAIS Véronique | Présidente  
CLERE Nicolas | Directeur  
BESSAGUET Flavien | Membre  
MAUQUEST Éric | Membre



Soutenue publiquement le :  
Mardi 22 Octobre 2024

**FACULTÉ  
DE SANTÉ**  
UNIVERSITÉ D'ANGERS

# ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussignée SANDADI Marine déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **29/07/2024**

# DECLARATION D'ENGAGEMENT DE L'AUTEUR

« Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation. »



# **LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS**

---

**Doyen de la Faculté :** Pr Nicolas Lerolle

**Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie :** Pr Sébastien Faure

**Directeur du département de médecine :** Pr Cédric Annweiler

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ABRAHAM Pierre	PHYSIOLOGIE	Médecine
ANGOULVANT Cécile	MEDECINE GENERALE	Médecine
ANNWEILER Cédric	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT	Médecine
ASFAR Pierre	REANIMATION	Médecine
AUBE Christophe	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
AUGUSTO Jean-François	NEPHROLOGIE	Médecine
BAUFRETTON Christophe	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BELLANGER William	MEDECINE GENERALE	Médecine
BIERE Loïc	CARDIOLOGIE	Médecine
BIGOT Pierre	UROLOGIE	Médecine
BONNEAU Dominique	GENETIQUE	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
BOUVARD Béatrice	RHUMATOLOGIE	Médecine
BOURSIER Jérôme	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
BRIET Marie	PHARMACOLOGIE	Médecine
CALES Paul	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CAMPONE Mario	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CASSEREAU Julien	NEUROLOGIE	Médecine
CLERE Nicolas	PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE	Pharmacie
CONNAN Laurent	MEDECINE GENERALE	Médecine
COPIN Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
COUTANT Régis	PEDIATRIE	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	PHYSIOLOGIE	Médecine
CRAUSTE-MANCIET Sylvie	PHARMACOTECHNIE HOSPITALIERE	Pharmacie
DE CASABIANCA Catherine	MEDECINE GENERALE	Médecine
DESCAMPS Philippe	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
D'ESCATHA Alexis	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
DINOMAIS Mickaël	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
DUBEE Vincent	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES	Médecine

DUCANCELLA Alexandra	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
DUVAL Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
DUVERGER Philippe	PEDOPSYCHIATRIE	Médecine
EVEILLARD Matthieu	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
FAURE Sébastien	PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	ANATOMIE	Médecine
FOUQUET Olivier	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
FURBER Alain	CARDIOLOGIE	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	PNEUMOLOGIE	Médecine
GOHIER Bénédicte	PSYCHIATRIE D'ADULTES	Médecine
GUARDIOLA Philippe	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
GUILET David	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
HAMY Antoine	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
HENNI Samir	MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
HUNAUT-BERGER Mathilde	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
IFRAH Norbert	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
JEANNIN Pascale	IMMUNOLOGIE	Médecine
KEMPF Marie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE	Médecine
LACOEUILLE FRANCK	RADIOPHARMACIE	Pharmacie
LACCOURREYE Laurent	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE	Médecine
LAGARCE Frédéric	BIOPHARMACIE	Pharmacie
LANDREAU Anne	BOTANIQUE/ MYCOLOGIE	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION	Médecine
LEBDAI Souhil	UROLOGIE	Médecine
LEGENDRE Guillaume	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
LEGRAND Erick	RHUMATOLOGIE	Médecine
LERMITE Emilie	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
LEROLLE Nicolas	REANIMATION	Médecine
LIBOUBAN Hélène	HISTOLOGIE	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
MARCHAIS Véronique	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
MARTIN Ludovic	DERMATO-VENEREOLOGIE	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION	Médecine
MENEI Philippe	NEUROCHIRURGIE	Médecine
MERCAT Alain	REANIMATION	Médecine
PAPON Nicolas	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie

PASSIRANI Catherine	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
PELLIER Isabelle	PEDIATRIE	Médecine
PETIT Audrey	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
PICQUET Jean	CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
PODEVIN Guillaume	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
PROCACCIO Vincent	GENETIQUE	Médecine
PRUNIER Delphine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
PRUNIER Fabrice	CARDIOLOGIE	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	MEDECINE GENERALE	Médecine
REYNIER Pascal	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
RICHARD Isabelle	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
RICHOMME Pascal	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
RODIEN Patrice	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
ROQUELAURE Yves	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
ROUSSEAU Audrey	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROUSSEAU Pascal	CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROY Pierre-Marie	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
SAULNIER Patrick	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
SERAPHIN Denis	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
SCHMIDT Aline	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	MEDECINE GENERALE	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	PNEUMOLOGIE	Médecine
UGO Valérie	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
URBAN Thierry	PNEUMOLOGIE	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	PEDIATRIE	Médecine
VENARA Aurélien	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
VERNY Christophe	NEUROLOGIE	Médecine
WILLOTEAUX Serge	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES

BAGLIN Isabelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	IMMUNOLOGIE	Médecine
BEGUE Cyril	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELIZNA Cristina	MEDECINE INTERNE	Médecine
BELONCLE François	REANIMATION	Médecine
BENOIT Jacqueline	PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BLANCHET Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
BOISARD Séverine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
BRIET Claire	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
BRIS Céline	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
CHEVALIER Sylvie	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
COLIN Estelle	GENETIQUE	Médecine
DERBRE Séverine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
DESHAYES Caroline	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE	Pharmacie
DOUILLET Delphine	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
FERRE Marc	BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	PHYSIOLOGIE	Médecine
GUELFF Jessica	MEDECINE GENERALE	Médecine
HAMEL Jean-François	BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	BIOTECHNOLOGIE	Pharmacie
HINDRE François	BIOPHYSIQUE	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	MEDECINE GENERALE	Médecine
KHIATI Salim	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
LEGEAY Samuel	PHARMACOCINETIQUE	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	NEUROCHIRURGIE	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
LEPELTIER Elise	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
LETOURNEL Franck	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
LUQUE PAZ Damien	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Médecine

MABILLEAU Guillaume	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE	Médecine
MALLET Sabine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
MAROT Agnès	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
MESLIER Nicole	PHYSIOLOGIE	Médecine
MIOT Charline	IMMUNOLOGIE	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	PHILOSOPHIE	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Médecine
PAPON Xavier	ANATOMIE	Médecine
PASCO-PAPON Anne	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
PECH Brigitte	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	SOCIOLOGIE	Médecine
PIHET Marc	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
POIROUX Laurent	SCIENCES INFIRMIERES	Médecine
PY Thibaut	MEDECINE GENERALE	Médecine
RINEAU Emmanuel	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION	Médecine
RIOU Jérémie	BIOSTATISTIQUE	Pharmacie
RIQUIN Elise	PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE	Médecine
RONY Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Médecine
ROGER Emilie	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
SAVARY Camille	PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Pharmacie
SCHMITT Françoise	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION THERAPEUTIQUE	Pharmacie
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	MEDECINE GENERALE	Médecine
VIAULT Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie

#### AUTRES ENSEIGNANTS

##### **ATER**

ELHAJ MAHMOUD Dorra	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
LEMAN Géraldine	BIOCHIMIE	Pharmacie

##### **ECER**

PIRAUX Arthur	OFFICINE	Pharmacie
HASAN Mahmoud	PHARMACIE GALENIQUE ET PHYSICO-CHIMIE	Pharmacie
BARAKAT Fatima	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie

**PRCE**

AUTRET Erwan	ANGLAIS	Santé
BARBEROUSSE Michel	INFORMATIQUE	Santé
COYNE Ashley	ANGLAIS	Santé
O'SULLIVAN Kayleigh	ANGLAIS	Santé
RIVEAU Hélène	ANGLAIS	

**PAST**

BEAUV AIS Vincent	OFFICINE	Pharmacie
BRAUD Cathie	OFFICINE	Pharmacie
CAVAILLON Pascal	PHARMACIE INDUSTRIELLE	Pharmacie
DILÉ Nathalie	OFFICINE	Pharmacie
GUILLET Anne-Françoise	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
MOAL Frédéric	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
KAASSIS Mehdi	GASTRO-ENTEROLOGIE	Médecine
GUITTON Christophe	MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION	Médecine
SAVARY Dominique	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
POMMIER Pascal	CANCEROLOGIE-RADIODERAPIE	Médecine
PICCOLI Giorgia	NEPHROLOGIE	Médecine

**PLP**

CHIKH Yamina	ECONOMIE-GESTION	Médecine
--------------	------------------	----------

**AHU**

CORVAISIER Mathieu	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
CHABRUN Floris	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
ROBIN Julien	DISPOSITIF MEDICAUX	Pharmacie

# REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, Monsieur Nicolas CLERE, de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Merci pour tous les conseils que vous m'avez donnés et pour votre confiance.

A Madame Véronique MARCHAIS, je vous remercie d'avoir accepté de présider ma thèse et d'avoir porté une attention particulière à mon sujet.

A Monsieur Flavien BESSAGUET, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

A Éric MAUQUEST, un grand merci de faire partie de ce jury. Merci de m'avoir accueillie avec bienveillance lors de mon stage de 3<sup>ème</sup> année. Je te remercie pour tous tes précieux conseils, mais aussi de m'avoir transmis ta vision de l'officine qui m'a vraiment aidé lors de mon choix de filière.

A toute l'équipe de la pharmacie cosséenne, merci de m'avoir accompagnée tout au long des derniers mois de stage. J'ai appris énormément de choses à vos côtés, merci de m'avoir donné cette rigueur de travail.

A l'ensemble de l'équipe des Halles, merci pour toutes ces années passées à vos côtés. Merci pour votre bonne humeur, c'était un plaisir de partager mes samedis avec vous.

A Brian, merci d'avoir joué le rôle de grand frère avant chaque examen.

A Maëlys, mon binôme de toujours ! Je n'aurai pas pu rêver mieux comme « secrétaire » de la commission solidarité. Tu as vraiment été mon binôme de la fac. Merci de m'avoir supportée en TP, merci pour les séances de révisions de dernière minute. Mais aussi, merci pour tous les moments de rigolades, nos nombreuses soirées, et à tes danses de qualité.

# REMERCIEMENTS

A Maëlide, mon petit rayon de soleil. Merci de toujours être présente dans les bons comme dans les mauvais moments.

A Alice, une rencontre inattendue, mais un coup de foudre au premier regard. A toutes nos soirées et à nos fous rires.

A Adèle, pour ton humour et la bonne humeur que tu as apporté dans notre trio de dernière année.

A mes parents, merci de toujours avoir cru en moi. Vous êtes mes piliers, vous avez toujours été là dans les moments de doutes, les moments plus difficiles, je sais que je pourrais toujours compter sur vous. Vous êtes mes modèles, je vous aime fort.

Mes petites sœurs, Elise et Amandine, merci pour votre soutien durant toutes mes années d'études. Je vous souhaite maintenant de réussir tous vos projets. Je suis fière de vous.

A Alexandre, ces quelques lignes ne pourront jamais décrire à quel point tu comptes pour moi. Tu es ma source de motivation, merci de m'encourager dans tous les moments de doute, merci de croire en moi. Il nous reste encore tant de projets à réaliser, de pays à parcourir... Je t'aime, mon petit poussin.

A Stéphanie et Laurent, merci pour votre présence et votre soutien.

A ma petite Mamie, merci de m'avoir accueillie durant toutes ces années. Je n'oublierai jamais les moments passés à tes côtés, c'est bien grâce à toi que j'ai pu réussir mes études. J'espère que Papi est fier de moi depuis les étoiles.

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : PRINCIPALES LIMITES DES ARNm QUI NECESSITENT DES STRATEGIES DE CIBLAGE ADAPTEES.....</b>	<b>2</b>
1. <b>Généralités sur l'ARNm<sup>1, 2</sup> .....</b>	<b>2</b>
2. <b>Comment obtient-on une réponse immunitaire à partir d'ARNm ?.....</b>	<b>4</b>
2.1.    Comment l'ARNm stimule l'immunité humorale et cellulaire ? <sup>5, 6</sup> .....	4
2.2.    Préparation in vitro des ARNm.....	7
3. <b>Quelles sont les raisons de la mauvaise biodisponibilité des ARNm ?.....</b>	<b>8</b>
3.1.    Dégredation rapide par les RNase ubiquitaires .....	8
3.2.    La membrane cellulaire .....	9
3.3.    L'environnement intracellulaire et la machinerie cellulaire .....	9
4. <b>Technique de vectorisation : défi technique et rôle majeur dans la réalisation d'un médicament .....</b>	<b>9</b>
4.1.    Structures lipidiques.....	10
4.2.    Les polymères/ les polyplexes .....	15
4.3.    Les lipopolyplexes .....	26
4.4.    Adjuvants et nanoparticules .....	31
4.5.    Systèmes de « ciblage actif » <sup>70</sup> .....	31
5. <b>Exemple de vecteurs utilisés pour transporter les ARNm.....</b>	<b>34</b>
6. <b>Conclusion : les vecteurs<sup>68</sup>.....</b>	<b>34</b>
7. <b>Assurer la bonne traduction en protéine : .....</b>	<b>35</b>
7.1.    Eléments structurels des ARNm <sup>18, 76</sup> .....	35
7.2.    La coiffe 5' <sup>78</sup> .....	36
7.3.    Régions 5'UTR et 3'UTR : stabilisateurs de séquence <sup>77, 78, 82</sup> .....	37
7.4.    Cadre de lecture ouvert (ORF) <sup>77</sup> .....	38
7.5.    Modification de la queue poly(A).....	40
7.6.    Utilisation d'ARNm auto-amplifiés (SAM) .....	41
8. <b>Choix du mode d'administration<sup>96, 97</sup> .....</b>	<b>44</b>
9. <b>Quels contrôles qualité ? .....</b>	<b>47</b>
9.1.    Déterminer la pureté et la stabilité de l'ARNm avant l'inoculation .....	47
9.2.    Sécurité : Vaccins ARNm vs vaccins « conventionnels » .....	48
<b>CHAPITRE 2 : APPORTS ET LIMITES DES ARNm DANS LA PRISE EN CHARGE DE NOMBREUSES PATHOLOGIES.....</b>	<b>49</b>
1. <b>Exemple de la COVID19 : Premier vaccin ARNm disponible sur le marché et espoir pour d'autres pathologies. .....</b>	<b>49</b>
2. <b>Lutte contre les pathologies infectieuses .....</b>	<b>50</b>
2.1.    Vaccins à ARNm ciblant le virus de la grippe <sup>107, 108, 109</sup> .....	50
2.2.    L'ARNm, un espoir pour les patients atteints de VIH ? <sup>114</sup> .....	53
2.3.    Vaccins ARNm : qu'en est-il des autres pathologies infectieuses ?.....	57
2.4.    Rôle dans la lutte à l'antibiorésistance. <sup>137</sup> .....	66
3. <b>Oncologie : Nouvelle thérapeutique ou traitement adjuvant dans la prise en charge des cancers ? .....</b>	<b>70</b>
3.1.    Présentation de la cellule cancéreuse et de son micro-environnement .....	70
3.2.    Cibles : exemple d'antigène associé aux tumeurs (TAAs) et antigènes spécifiques de la tumeur (TSA) .....	73

3.3.	Réduire l'impact de l'environnement immunosuppressif produit par la tumeur, indispensable pour garantir l'efficacité d'un vaccin .....	76
3.4.	Quels biomarqueurs pour évaluer la réponse aux traitements ? <sup>146</sup> .....	83
3.5.	Etudes en cours : promesse d'une amélioration de la prise en charge des cancers. ....	84
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>92</b>

# Table des illustrations

Figure 1: De l'ADN à l'ARN <sup>4</sup> .....	3
Figure 2: Voies activées dans la réponse adaptative <sup>4</sup> .....	5
Figure 3: Activation de l'immunité par l'ARNm <sup>9</sup> .....	6
Figure 4: Les étapes de production in vitro des transcrits d'ARNm. <sup>5</sup> .....	7
Figure 5: Différentes structures de lipides cationiques et ionisables utilisés dans la formulation de vaccin. <sup>23</sup> .....	11
Figure 6: Exemple de structures zwitterioniques. <sup>30</sup> .....	13
Figure 7: Formation des PLGA. <sup>41</sup> .....	17
Figure 8: Influence sur l'efficacité et la toxicité de trois poly (acide acrylique) <sup>46</sup> .....	19
Figure 9: présentation des différents types d'hydrogels. <sup>48</sup> .....	20
Figure 10: Exemple de dendrimère : PAMAM-PEG-Mannose. <sup>50</sup> .....	22
Figure 11: Récapitulatif des différents agencements des polymères. <sup>38</sup> .....	25
Figure 12: Structure schématisée d'un lipopolyplex. <sup>61</sup> .....	26
Figure 13: Exemple de structure des Lipopolyplexes à base de PEI. <sup>64</sup> .....	28
Figure 14: Exemple de couronne à la surface des LNP. <sup>72</sup> .....	32
Figure 15: Exemple de vecteurs en cours d'études et leurs indications. <sup>51</sup> .....	34
Figure 16: Eléments de structures des ARNm produit in vitro. <sup>77</sup> .....	35
Figure 17: Structure de coiffe ARCA et de coiffe "Clean Cap". <sup>79</sup> .....	37
Figure 18: Structure et mode d'action des ARNm auto-amplifiés. <sup>95</sup> .....	42
Figure 19: Comparaison des différentes structures d'ARNm. <sup>95</sup> .....	43
Figure 20: voies d'administrations des vaccins ARNm. <sup>96</sup> .....	44
Figure 21: Synthèse non exhaustive des domaines de recherches des ARNm. <sup>106</sup> .....	49
Figure 22: structure des virus de la grippe. <sup>108</sup> .....	51
Figure 23: structure du virus du VIH-1. <sup>114</sup> .....	54
Figure 24: construction d'un vaccin ARNm-LNP codant les protéines prM et ENV. <sup>125</sup> .....	58
Figure 25: Protéines couramment utilisées par les vaccins à ARNm pour cibler les virus. <sup>11</sup> .....	60
Figure 26: Recommandation de la prise en charge de l'infection à <i>Plasmodium falciparum</i> non compliquée d'après l'OMS (organisation mondiale de la santé). <sup>132</sup> .....	61
Figure 27: Recommandation de la prise en charge dans l'infection à plasmodium des groupes à risque d'après l'OMS (organisation mondiale de la santé). <sup>132</sup> .....	62
Figure 28: Nombre de décès et principales causes (à gauche) en 2019 et projection du nombre de décès dus aux infections par RAM (bactéries résistantes aux antimicrobiens) en 2050 (en rouge à droite). <sup>137</sup> ..	67
Figure 29: Micro-environnement tumoral ; différentes populations cellulaires. <sup>144</sup> .....	71
Figure 30: Exemple de TAAs ainsi que leur fonction et leur localisation au sein de l'organisme. <sup>148</sup> .....	74
Figure 31: Essais cliniques en cours utilisant les TAAs associés ou non à d'autres thérapeutiques. <sup>150</sup> .....	75
Figure 32: Exemple d'inhibiteurs de points de control et leurs mécanismes. <sup>158</sup> .....	79

## **Table des tableaux**

Tableau I: Synthèse non exhaustive des spécifiques des voies d'administrations des vaccins à ARNm ...	45
Tableau II: Protéines codées par le gène du VIH-1 et leurs fonctions. <sup>115</sup> .....	55
Tableau III: Résumé non exhaustif de résultats publiés des essais de vaccins contre le cancer à ARNm par type de formulation. <sup>164</sup> .....	87

## Liste des abréviations

ARNm	Acide ribonucléique messager
ADN	Acide désoxyribonucléique
IVT	In vitro
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
LT	Lymphocytes T
LB	Lymphocytes B
LNP	Nanoparticule lipidique
PEI	Poly(éthylèneimine)
PLGA	Poly (acide lactique-co-glycolique)
FDA	Food and drug administration
PBAE	Poly( $\beta$ -amino ester))
PEG	Polyéthylène glycol
SAM	ARNm auto-amplifié
ARNdb	ARN double brin
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
PCR	Polymerase Chain Reaction
DOTMA	1,2-diocta-décényl-3-triméthyammonium-propan
DOTAP	1,2-dioléoyl-3-triméthylammoniumpropane
DDAB	Diméthyldioctadécylammonium
DOPE	1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PK	Pharmacocinétique
CD	Cellule dendritiques
FDA	Food and drug administration
LA	Acide lactique
GA	Acide glycolique
PEA	Poly (acide 2-éthyl acrylique)
P2PA	Poly (acide 2-propyl acrylique)
PLA	Poly acide lactique
PVA	Alcool polyvinyle
PCL	Polycaprolactone
PAMAM	Polyamidoamine
PLL	Poly-L-lysine
PPI	Polypropylèneimine
PVES	Succinate de vitamine E
SORT	Nanoparticules de ciblage sélectif d'organes
APOe	Apolipoprotéine
LDLR	Récepteur des lipoprotéines de basse densité
EMA	Agence européenne des médicaments
PABP	Protéine de liaison poly-A
PAP	Poly-A polymérase
SINV	Virus Sindbis

SFV	Virus Semliki Forest
VEEV	Encéphalite équine vénézuélienne
saARN	Self-amplifying ARN/ ARN auto-amplifié
IM	Intra-musculaire
IV	Intra-veineux
SC	Sous-cutané
TAR	Thérapie antirétrovirale
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
MEC	Matrice extracellulaire
CAF	Fibroblastes associés aux cancers
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells/ cellules myéloïdes suppressives
VEGF	Facteur de croissance endothéial vasculaire
TAM	Tumor associated macrophage/macrophages associés aux tumeurs
TAA	Antigènes associés aux tumeurs
TSA	Antigènes spécifiques de la tumeur
CTA	Antigènes du cancer/des testicules
CAR	Récepteur d'antigènes chimériques

# **Introduction**

Le succès des vaccins à ARNm (acide ribonucléique messager) contre la COVID-19 a mis en lumière l'émergence d'une nouvelle génération de vaccins. Cette technologie innovante a permis de répondre efficacement et rapidement à cette crise sanitaire mondiale sans précédent.

Ces avancées ont suscité un intérêt croissant pour les applications thérapeutiques de l'ARNm, dépassant largement le cadre des maladies virales. L'un des principaux atouts des thérapies à base d'ARNm réside dans leur flexibilité, permettant des traitements personnalisés et adaptés à diverses maladies. Les vaccins ARNm offrent alors une dimension thérapeutique en plus de sa dimension prophylactique initiale. Cependant, malgré les promesses et les succès initiaux, plusieurs défis demeurent. La stabilité de l'ARNm, sa sécurité à long terme, ainsi que son impact immunitaire sont autant de questions qui nécessitent une analyse approfondie.

L'objectif principal de cette thèse est de faire ressortir les avantages et les limites des thérapies à base d'ARNm. Ceci, afin d'évaluer l'ARNm comme une perspective thérapeutique prometteuse, tout en exposant les défis qui se posent. La méthodologie repose sur une revue de la littérature, une analyse détaillée des données existantes, et une comparaison de ces études.

Dans une première partie, des généralités sur les ARNm et leur manière de stimuler le système immunitaire seront décrites. Cette partie permettra de comprendre pourquoi et comment des techniques de vectorisation et de modification des éléments structurels sont nécessaires pour la bonne traduction des ARNm en protéines.

Puis dans une seconde partie, les résultats des études récentes et les perspectives pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses seront étudiés. De plus, le domaine de l'oncologie qui bénéficie aussi de nombreux essais cliniques dans l'utilisation des thérapies ARNm sera traité.

# **Chapitre 1 : Principales limites des ARNm qui nécessitent des stratégies de ciblage adaptées.**

## **1. Généralités sur l'ARNm<sup>(1, 2)</sup>**

L'acide ribonucléique messager (ARNm) est une molécule mise en avant lors de la pandémie de Covid19. Cependant c'est une molécule qui a été découverte il y a plusieurs décennies et présentée dès 1961 par Jacob et Monod. Cette molécule est le résultat de l'expression de l'information contenue dans l'ADN. Elle permet de transmettre l'information contenu dans le génome et code pour des protéines spécifiques.

La vaccination ARNm a été largement étudiée en raison de la capacité des acides nucléiques à coder une large gamme d'antigènes. L'ARNm est constitué de bases azotées classées en bases puriques (l'adénine et la guanine) et en bases pyrimidiques (la cytosine et l'uracile). Ces bases sont liées à un pentose que l'on appelle ribose. Enfin trois phosphates se lient au ribose via une liaison ester pour former le nucléotide. L'assemblage de ces éléments forme alors les acides ribonucléiques.

La première étape de la synthèse d'ARNm dans l'organisme s'appelle la transcription. Lors de cette étape, un segment d'ADN est copié par l'ARN polymérase pour former un transcript pré-messager. Puis ce transcript subit une étape d'épissage. Cette étape de maturation permet à l'ARNm de rejoindre le cytoplasme. L'ARNm mature est doté d'un chapeau (cap) à son extrémité 5' et d'une queue poly-A à son extrémité 3'.

Au sein du cytoplasme l'ARNm est traduit en protéine par le ribosome. Ce dernier associe chaque codon à un acide aminé afin de former une protéine spécifique. C'est le codon initiateur qui détermine le cadre de lecture tandis que la séquence se termine par le codon stop (*Figure 1*).

Chaque enchainement de bases est donc important pour la formation future de la protéine souhaitée. En effet chaque base conditionne l'acide aminé formé. L'ajout ou la suppression d'une base peut modifier le cadre de lecture et conduire à la production d'une protéine totalement différente de celle souhaitée initialement.

Au vu de la structure de la molécule d'ARNm, il est aisément de comprendre que celle-ci peut se dégrader facilement. En effet les liaisons phosphodiesters sont sujettes à l'hydrolyse médiée par les nucléases ubiquitaires du corps. C'est pourquoi il est important de développer des structures de défense lors de la formulation des vaccins. Sans moyen de protection, l'ARNm sera dégradé avant d'atteindre la cellule cible. Ainsi, le moyen idéal de délivrer l'ARNm serait d'utiliser un matériau qui le protège de la dégradation et facilite une absorption cellulaire efficace après une simple injection.

La production d'ARNm « thérapeutiques » de haute qualité, hautement traduisibles et n'induisant pas d'inflammation grave, constituait jusqu'à très récemment des limites majeures dans ce domaine. Récemment, des réponses ont été apportées par un certain nombre d'innovations, notamment l'incorporation de nucléotides modifiés, l'optimisation des séquences codantes et la purification de l'ARNm par chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour éliminer les contaminants à base d'ARN double brin (ARNdb)<sup>(3)</sup>.

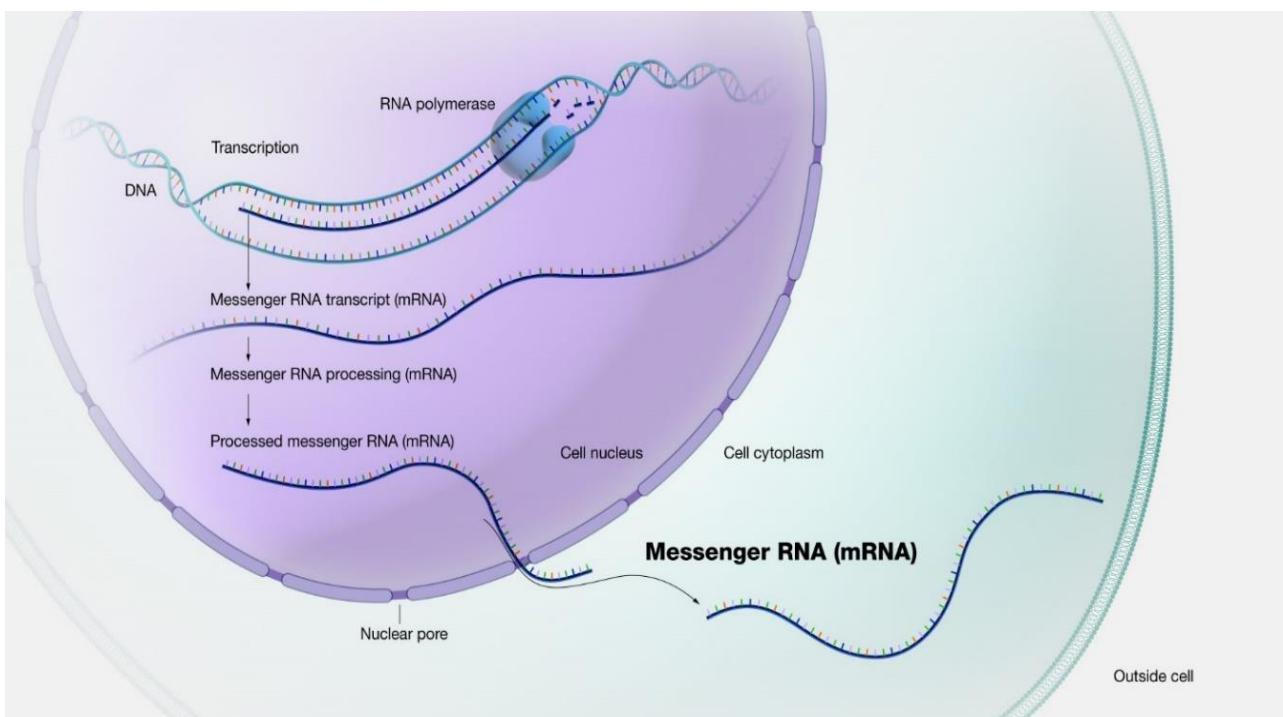


Figure 1: De l'ADN à l'ARN<sup>(4)</sup>

## **2. Comment obtient-on une réponse immunitaire à partir d'ARNm ?**

L'ARN sert de matrice dans la formation des protéines. C'est donc à partir de ces protéines que le corps est capable d'initier une immunité.

### **2.1. Comment l'ARNm stimule l'immunité humorale et cellulaire<sup>(5, 6)</sup> ?**

L'ARNm doit pénétrer dans le cytosol. A l'intérieur de la cellule les ARNm sont reconnus par des récepteurs ce qui entraîne la traduction en protéines. Ces protéines nouvellement formées, sont reconnues comme des antigènes et sont responsables de l'activation de notre système immunitaire.

C'est donc l'immunité adaptative qui entre en jeu. L'immunité adaptative est médiée par les lymphocytes. Elle permet d'apporter une réponse spécifique pour un antigène présenté. Les lymphocytes sont divisés en deux grands groupes : les lymphocytes T (LT) responsables de l'immunité à médiation cellulaire et les lymphocytes B (LB) sécrétaires d'anticorps responsables de l'immunité humorale (*Figure 2*). Les cellules cibles de la réponse vaccinale sont les CPA : cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières sont capables de reconnaître les agents pathogènes et d'activer notre immunité. Il peut s'agir de monocytes, de macrophages, de lymphocytes B ou de cellules dendritiques. Dans la stratégie vaccinale, ce sont les cellules dendritiques qui seront ciblées majoritairement car elles sont considérées comme « les sentinelles du corps » et sont capables de migrer vers les ganglions pour activer les lymphocytes T.

À la surface de chaque CPA se trouvent les molécules du CMH. Ces dernières assurent la présentation des antigènes aux lymphocytes T afin de les activer.

Lorsque les lymphocytes T reconnaissent les peptides nouvellement formés via leur récepteur « TCA », une réponse ciblée est enclenchée. Dans un deuxième temps, des molécules de co-stimulation sont sécrétées afin d'amplifier la réponse des lymphocytes T tel que ; des médiateurs de la réponse inflammatoire (par exemple l'IL-1, les interférons de type I), des molécules de co-stimulation (par exemple CD40, CD80, CD86), et des cytokines (par exemple IL-4, IL-12). La combinaison de tous ces signaux entraîne l'activation et la différenciation des cellules T. Enfin, les lymphocytes se divisent en deux classes : les

lymphocytes T auxiliaires appelés TCD4 et les lymphocytes TCD8. Les lymphocytes auxiliaires sont chargés de recruter les autres cellules de l'immunité tandis que les TCD8 participent directement à la lyse de la cellule infectée.

L'immunité humorale, quant à elle, fait intervenir les lymphocytes B sécrétaires d'anticorps. Ces derniers vont alors se lier spécifiquement à l'antigène qui a stimulé leur production. La liaison permet aux anticorps de bloquer la capacité aux antigènes de se lier avec la cellule hôte. De plus la liaison anticorps-antigène marque les agents pathogènes afin qu'ils puissent être reconnus et détruits par les cellules phagocytaires ; c'est ce que l'on appelle « l'opsonisation ». Ces lymphocytes peuvent emprunter deux voies : les lymphocytes B mémoire ou les lymphocytes B sécrétaires d'anticorps. (Figure 2)

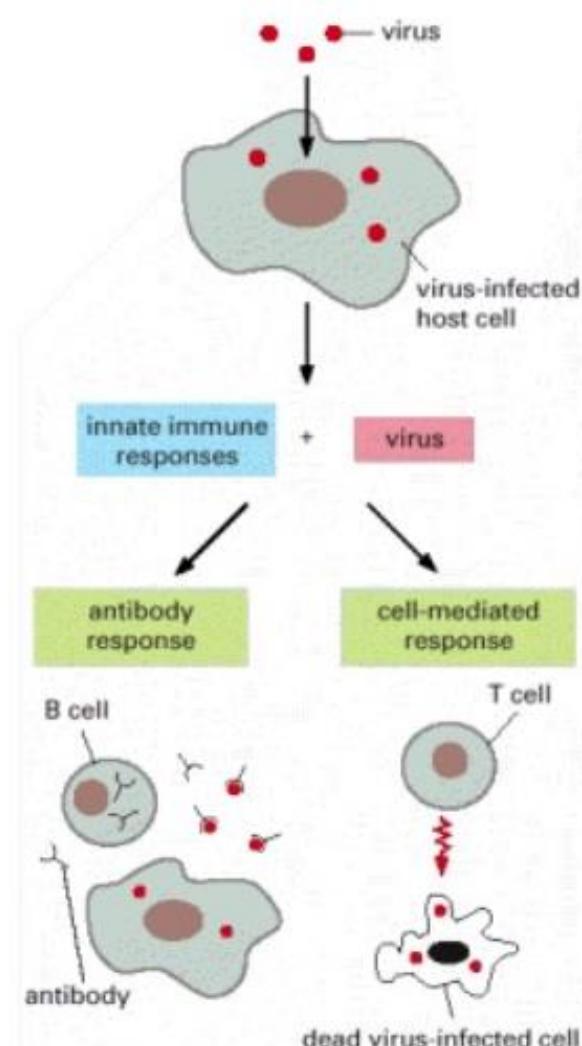


Figure 2: Voies activées dans la réponse adaptative<sup>(4)</sup>

Les antigènes nouvellement formés à partir d'ARNm empruntent alors différentes voies pour activer les LT et les LB (*Figure 3*). La première possibilité est la dégradation de l'antigène par le complexe du protéasome. Les fragments sont alors reconnus par les protéines du CMH I. Le complexe CMH I présente alors les fragments aux cellules T cytotoxiques (TCD8).

La deuxième possibilité est que les antigènes sécrétés peuvent être absorbés par les cellules et être dégradés par les endosomes. Cette deuxième voie fait intervenir les protéines du CMH II qui activent les lymphocytes T auxiliaires capables d'activer à leur tour les lymphocytes B.

Enfin la dernière voie est la capacité des antigènes à stimuler directement l'immunité humorale. La présentation des antigènes à la surface des CPA sera reconnue par les récepteurs BCR des lymphocytes B. Les lymphocytes vont s'activer en lymphocytes B actifs sécréteurs d'anticorps ou en lymphocytes B mémoire<sup>(5, 7, 8)</sup>.

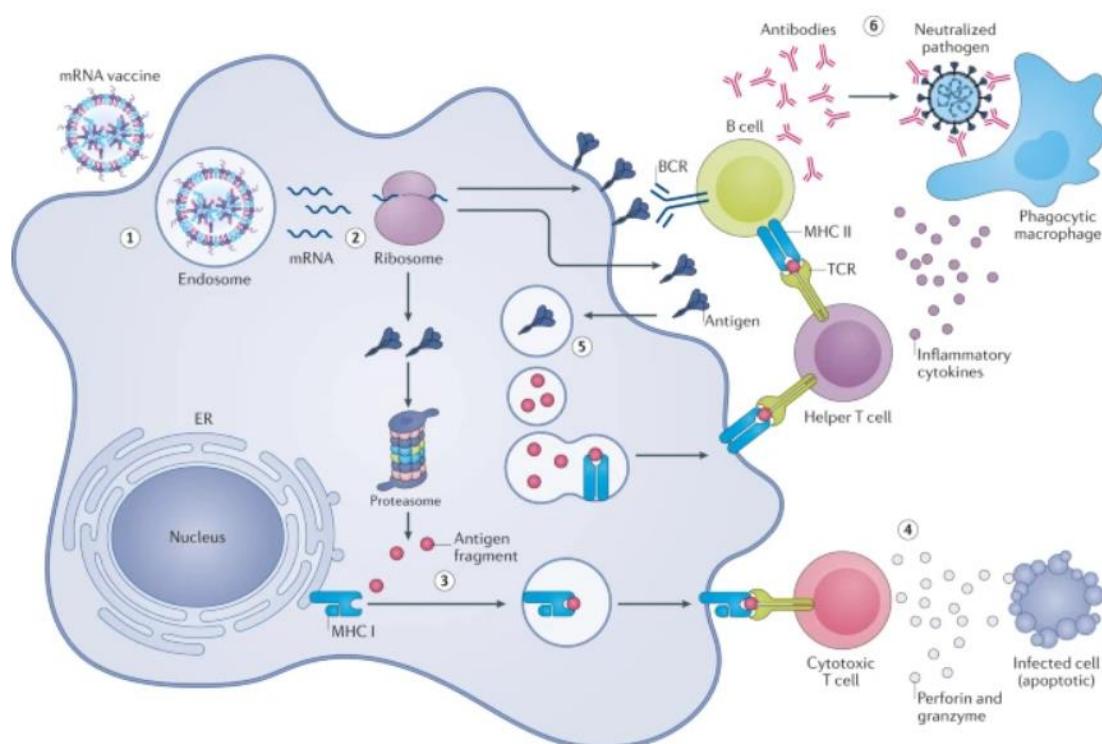


Figure 3: Activation de l'immunité par l'ARNm<sup>(9)</sup>

## 2.2. Préparation in vitro des ARNm

Les ARNm préparés in vitro doivent permettre la production de l'antigène choisi. La molécule doit comporter une structure similaire aux ARNm endogènes. Pour cela le transcript sous forme de molécule simple brin, doit comporter une section de 5' vers 3', un cadre de lecture ouvert (ORF), une coiffe 5' composé de 7 méthyl-guanosine, une extrémité 3', une queue de polyA et des régions non traduites UTR.

Certains transcrits pour la formulation d'ARNm auto-amplifié contiennent des séquences qui codent pour l'ARNm polymérase. Le rôle de cette polymérase est d'amplifier le nombre de transcrits d'ARNm. Cette méthode permet de produire de grandes quantités de transcrits sans augmenter la dose de vaccin.

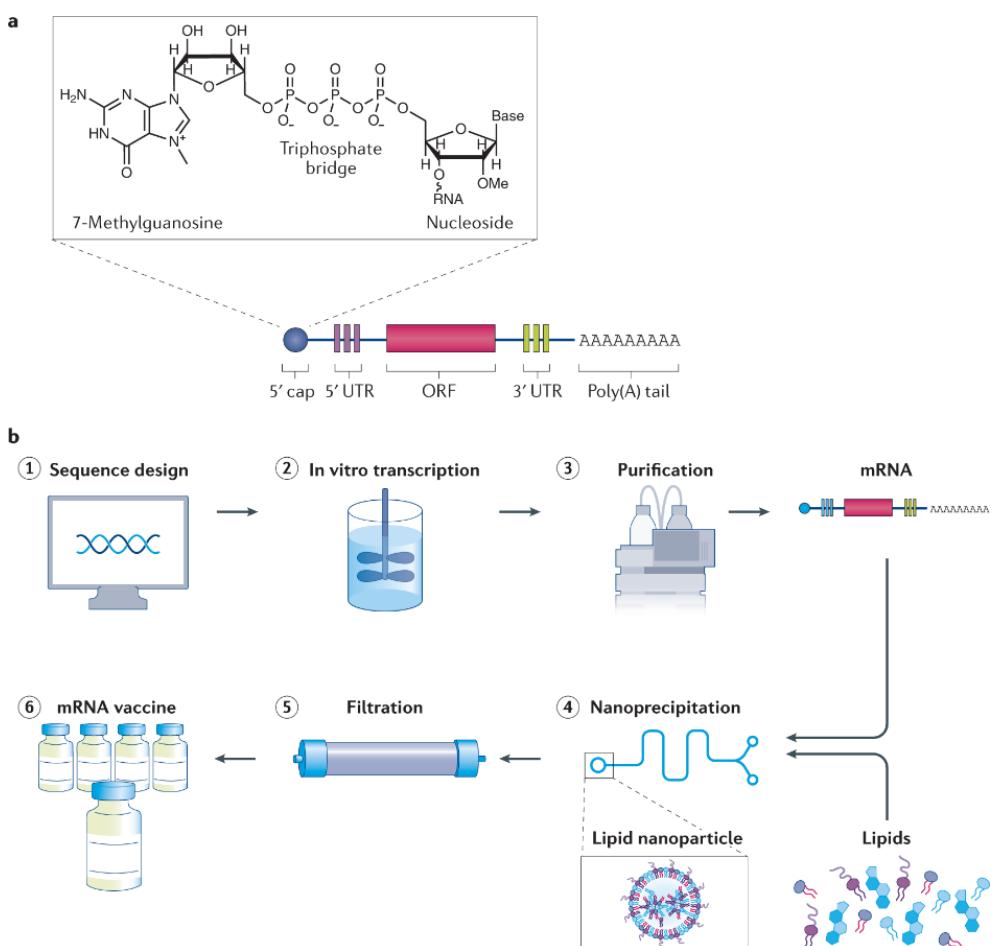


Figure 4: Les étapes de production in vitro des transcrits d'ARNm<sup>(5)</sup>

La première étape de préparation est donc d'identifier l'agent pathogène puis de réaliser le séquençage de son génome. Une fois cette étape réalisée, la séquence de l'antigène cible est insérée dans une construction d'ADN plasmidique. Ce dernier est transcrit en ARNm par les ARN polymérasées bactériologiques. Le transcrit subit des étapes de purification par HPLC (*Figure 4*).

L'ARNm est ensuite associé à un vecteur, ce qui forme des nanoparticules. La solution est filtrée afin d'éliminer les solvants et les ARNm non encapsulés. La solution de vaccin est conservée dans des flacons stériles<sup>(7, 10)</sup>.

### **3. Quelles sont les raisons de la mauvaise biodisponibilité des ARNm ?**

Ceci s'explique par les caractéristiques physico-chimiques des acides nucléiques. En effet, les ARNm présentent des caractéristiques défavorables à leur utilisation comme agent thérapeutique. Leur taille, leur absorption cellulaire limitée et leur sensibilité à la dégradation enzymatique sont les paramètres majeurs qui limitent leur utilisation<sup>(12)</sup>.

Ce sont les avancées concernant la formulation qui ont rendu l'utilisation des ARNm possible.

#### **3.1. Dégradation rapide par les RNase ubiquitaires**

Dans son parcours au sein de l'organisme l'ARNm doit faire face à un premier obstacle : les nucléases. Ces dernières sont présentes de manière ubiquitaire au sein de l'organisme et sont responsables de la dégradation des ARNm. Plusieurs méthodes de suivi (électrophorèse, FISH, PCR...), ont effectivement montré l'instabilité des ARNm nus dans les liquides extracellulaires. C'est pour cela que les premières études basées sur l'injection d'ARNm nus n'ont pas démontré d'efficacité sur la stimulation de notre système immunitaire<sup>(13, 14)</sup>.

Des méthodes de suivi par fluorescence ont permis d'estimer la demi-vie des ARNm nus à quelques minutes dans les échantillons biologiques. Cette demi-vie est largement augmentée lorsque les ARNm sont encapsulés dans des vecteurs. Nous verrons par la suite que le choix d'un bon vecteur est déterminant dans la formulation des vaccins à base d'acides nucléiques<sup>(13)</sup>.

### **3.2. La membrane cellulaire**

Le deuxième point critique dans le parcours de l'ARNm est le passage des membranes cellulaires. La membrane cellulaire est une barrière dynamique chargée négativement sur le versant extracellulaire. Diverses pompes et canaux ioniques contribuent au maintien d'un potentiel négatif (-40 à -80 mV).

Or, les molécules d'ARNm sont elles aussi chargées négativement. C'est pourquoi les ARNm, aux abords des membranes, agissent comme deux aimants dont les pôles de même nature se repoussent. Les ARNm nus ne peuvent donc pas traverser efficacement les membranes cellulaires et ont impérativement besoin d'un véhicule qui permettra leur endocytose<sup>(13)</sup>.

### **3.3. L'environnement intracellulaire et la machinerie cellulaire**

Une fois le passage de la membrane cellulaire effectuée, l'ARNm doit être traduit en protéine. La séquence d'ARNm doit être construite de manière optimale afin d'obtenir la bonne protéine en quantité suffisante. De plus l'ARNm ne doit pas être détruit trop précocement par les organites intracellulaires et les endonucléases<sup>(14)</sup>. C'est pourquoi les vecteurs doivent fournir des propriétés d'échappement endosomal afin d'améliorer la biodisponibilité<sup>(15)</sup>.

## **4. Technique de vectorisation : défi technique et rôle majeur dans la réalisation d'un médicament**

Au vu des caractéristiques des ARNm nus et de leur sensibilité à la dégradation par les nucléases, il est impératif d'utiliser des vecteurs pour accroître leur biodisponibilité.

Les nanotechnologies permettent de créer des complexes adaptés pour la délivrance d'acides nucléiques. Le processus de vectorisation nécessite alors une liaison correcte entre les nanomatériaux et les molécules d'ARNm. De plus, les vecteurs doivent permettre la bonne absorption par les cellules et un échappement endosomal suffisant pour que les molécules d'ARNm soient traduites en protéines en quantité suffisante<sup>(17, 18)</sup>.

Le choix d'un vecteur se définit par sa stabilité, son innocuité vis-à-vis de l'organisme ainsi que la bonne reproductibilité pour la production future des vaccins à grande échelle.

## 4.1. Structures lipidiques

Les vecteurs à base de molécules lipidiques sont ceux qui ont été utilisés dans la formulation des vaccins contre la Covid19 et figurent parmi les plus étudiés<sup>(19)</sup>.

### 4.1.1. Formulation d'un composé lipidique

Les LNP (*lipid nanoparticules*) sont généralement composées d'un amino-lipide, d'un phospholipide, de cholestérol et d'un polyéthylène glycol (PEG).

L'amino-lipide est semblable aux lipides présents dans l'organisme, c'est le composé qui est considéré comme responsable de l'absorption cellulaire et de la bonne tolérance.

Le phospholipide, quant à lui, soutient la structure de la bicoche lipidique et augmente la fusion entre le LNP et la cellule. Il contribue à l'échappement endosomal, ce qui améliore la biodisponibilité de l'ARNm. Puis, la molécule de cholestérol permet d'améliorer la stabilité de la structure et facilite la libération des nucléotides<sup>(20, 21)</sup>.

Enfin, il est possible d'ajouter des PEG (polyéthylène glycol). Ces derniers agissent comme des agents stabilisateurs. Ils contribuent à l'augmentation de la demi-vie des nanoparticules en réduisant la liaison avec les protéines plasmatiques. Leur degré de saturation ainsi que la longueur de leur chaîne alkyle influencent le poids et la taille des nanoparticules.

### 4.1.2. La synthèse

La méthode de synthèse des particules lipidiques est un point critique dans l'efficacité des vaccins. En effet, elle affecte à la fois la taille des nanoparticules et l'efficacité de l'encapsulation. Actuellement, le process majoritairement utilisé est de mélanger directement une phase lipide-éthanol avec une solution aqueuse d'ARN.

L'éthanol est utilisé comme agent de stabilisation. Des résultats soulignent cependant l'importance de son élimination rapide dans le système, car à terme l'éthanol déstabilise les nanoparticules lipidiques<sup>(16, 22)</sup>.

### 4.1.3. Lipides cationiques et ionisables

Cette classe de lipide se différencie par le port d'une charge positive à leur surface (*Figure 5*).

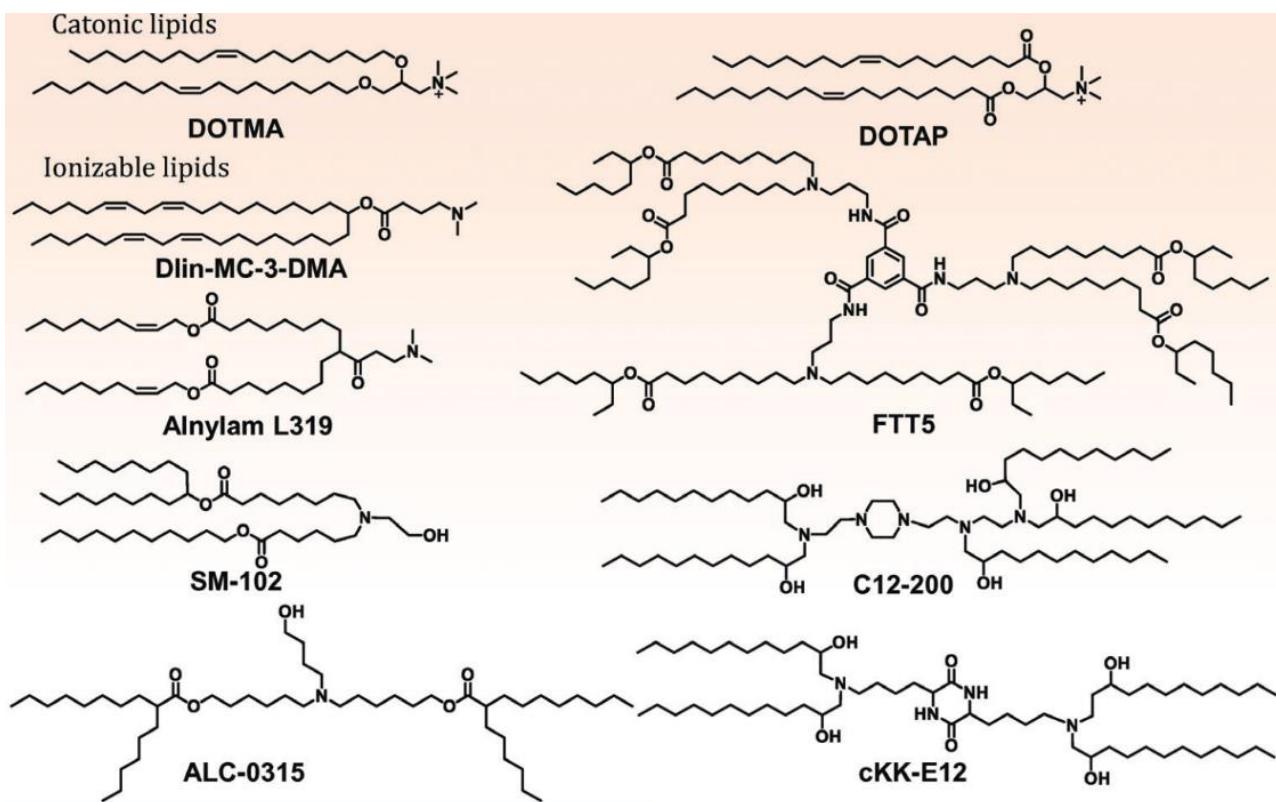


Figure 5: Différentes structures de lipides cationiques et ionisables utilisées dans la formulation de vaccin<sup>(23)</sup>

#### 4.1.4. Lipides cationiques<sup>(24, 25)</sup>

Les lipides cationiques portent des ammoniums quaternaires alkylés et conservent leur charge positive indépendamment du pH du milieu dans lequel ils se trouvent. Les structures majoritairement utilisées sont : le 1,2-diocta-décényl-3-triméthyammonium-propan (DOTMA), le (1,2-dioléoyl-3-triméthylammo niump propane) (DOTAP), le diméthyldioctadécylammonium (DDAB) et le 3 3β- [N- (N', N'- diméthylaminoéthane) carboyl]cholestérol(DC-cholestérol). Les têtes chargées positivement peuvent alors former des complexes par adsorption électrostatique avec les ARN chargés négativement<sup>(24, 25)</sup>. Les complexes formés sont délivrés dans le cytosol en fusionnant avec la membrane cellulaire endosomale. C'est-à-dire que la libération des acides nucléiques se fait une fois la nanoparticule intériorisée.

Cependant bien que les lipides cationiques présentent une efficacité d'administration satisfaisante, la charge positive permanente, entraîne une toxicité importante *in vivo* et peut potentiellement engendrer des effets indésirables. De plus avec la présence d'une charge positive permanente, les nanoparticules risquent d'être adsorbées à la surface des protéines plasmatiques, ce qui peut réduire l'efficacité d'administration<sup>(24)</sup>.

#### **4.1.5. Lipides ionisables<sup>(24, 26)</sup>**

Le lipide ionisable, quant à lui, est une structure amphiphile contenant une ou plusieurs amines ionisables. Il acquiert alors une charge positive par protonation des amines, lorsque le pH du milieu diminue. Désormais, les recherches portent plutôt sur ces lipides dépendant du pH, en raison d'une toxicité abaissée par rapport aux lipides cationiques.

En effet, ces lipides sont des matériaux neutres en milieu physiologique. Dans la circulation systémique, le pH se trouve autour de 7,4. Le pH est donc inférieur au pKa du groupement amine des lipides et empêche leur protonation. Cela permet de baisser la toxicité du vecteur et de permettre une meilleure internalisation au sein de la cellule.

Une fois parvenu dans le cytosol, le vecteur fusionne avec la membrane endosomale. Cette fois-ci le pH endosomal est inférieur au pKa des groupements amine, ce qui induit une protonation des amines. La charge positive, ainsi formée, favorise alors la fusion des nanoparticules lipidiques avec la membrane endosomale entraînant la libération de l'ARNm. Dans l'idéal les lipides ionisables auront un pKa compris entre 6 et 7.

#### **4.1.6. Lipides zwitterioniques**

Enfin il est possible d'introduire des lipides auxiliaires dans la structure. Par exemple, les lipides zwitterioniques DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) et 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) sont largement utilisés pour améliorer l'efficacité des nanoparticules<sup>(24,27)</sup>. Leur particularité est de posséder en même temps une charge positive et une charge négative. (*Figure 6*)

Ces lipides zwitterioniques pourraient jouer un rôle d'assistance lors de l'assemblage des nanoparticules lipidiques en stabilisant les interactions électrostatiques entre les lipides cationiques ionisables, l'ARN et les molécules d'eau. De plus, ils améliorent l'efficacité de la transfection en favorisant la fusion membranaire tout en stabilisant les LNP en générant diverses géométries avec des chaînes acyles. De plus ils déstabilisent la membrane endosomale ce qui favorise la fuite endosomale des nanoparticules<sup>(28, 29)</sup>.

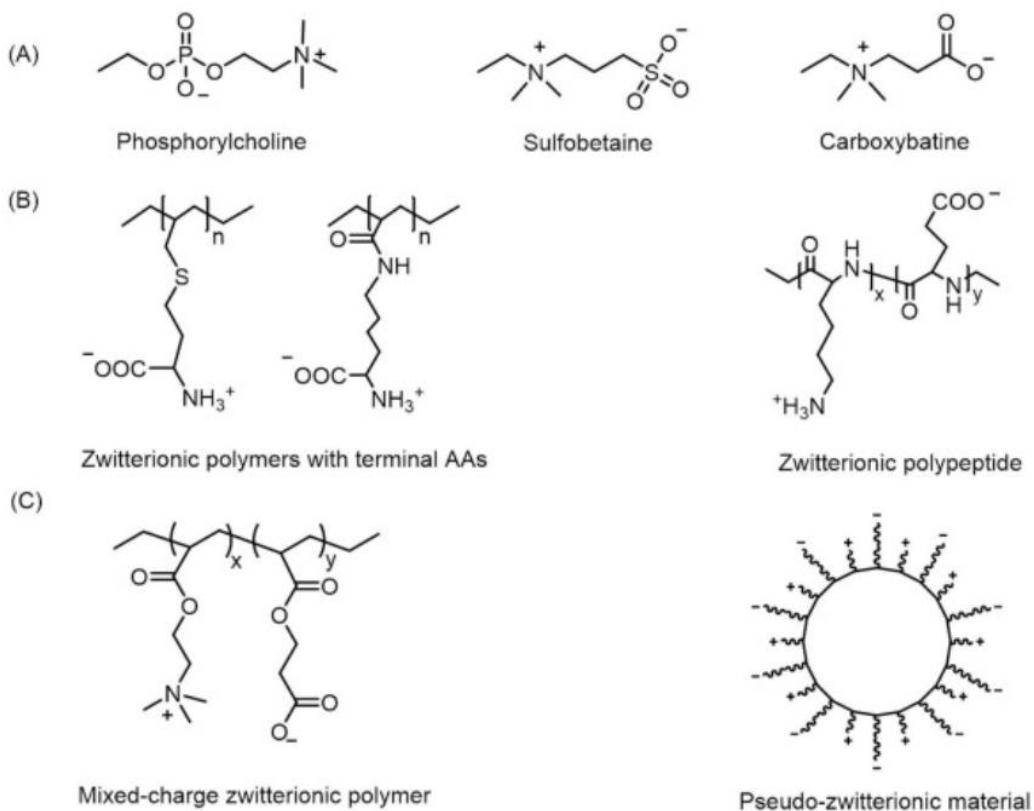


Figure 6: Exemple de structures zwitterioniques<sup>(30)</sup>

#### 4.1.7. Influence de la chaîne des phospholipides<sup>(31, 32)</sup>

Au-delà de l'influence du groupement cationique ou ionisable, la structure propre de chaque lipide peut améliorer la délivrance. Il est donc important de prendre en compte la longueur de la chaîne ainsi que le nombre d'insaturations présentes.

La présence des chaînes insaturées est donc indispensable, car elle permet de moduler plusieurs paramètres physico-chimiques, notamment le pKa. Cela représente alors une opportunité d'améliorer le taux d'encapsulation, d'absorption cellulaire, ainsi que le taux d'échappement endosomal. L'optimisation de la structure des phospholipides est donc un élément à prendre en compte pour assurer la bonne délivrance des ARNm.

#### **4.1.8. Limites des nanoparticules lipidiques**

Les nanoparticules lipidiques apparaissent comme des vecteurs prometteurs, cependant plusieurs points restent à améliorer. Premièrement, leur longue demi-vie tissulaire pourrait contribuer à des effets secondaires défavorables. En outre, comme les vecteurs peuvent induire une activation du système immunitaire, cela peut entraîner une réaction allergique voir un choc anaphylactique. Il est donc important de continuer d'alimenter les banques de données sur les différentes structures lipidiques. En fonction de l'objectif thérapeutique, cela permettrait de choisir plus facilement les catégories de lipides qui offrent une stabilité chimique convenable, une clairance tissulaire optimale et une efficacité de diffusion de l'ARNm<sup>(21, 33)</sup>.

Deuxièmement, la teneur et la nature des PEG sont aussi à prendre en compte. L'addition de PEG peut réduire l'activation du complément et ces derniers peuvent également avoir un effet négatif sur l'absorption cellulaire et pourraient entraîner une hypersensibilité après des injections répétées<sup>(15)</sup>.

Enfin, la taille des particules a aussi son importance. Les études tendent à montrer que les particules de petites tailles ont un volume de distribution plus important que les particules de plus grande taille<sup>(34)</sup>. La majorité des particules de diamètre supérieur à 150nm sont retenues au site d'injection. Cette propriété présente un avantage lorsque le vaccin doit agir au niveau d'un site spécifique ; par exemple dans le cadre de thérapies anticancéreuses. Cependant cet avantage devient une contrainte si le vaccin doit être administré de manière systémique. Les particules de diamètre trop important ont plus de risque d'être reconnues et éliminées par le système du complément parce qu'elles présentent un plus grand nombre de sites de reconnaissance sur leur surface<sup>(16)</sup>.

Une étude a mesuré l'immunogénicité des nanoparticules en fonction de leur taille sans modification de la composition lipidique. Les LNP de petit diamètre se sont montrés moins immunogènes chez les souris, cependant toutes les tailles de particules testées ont produit une réponse immunitaire robuste chez les primates non humains. La taille idéale de la particule est donc définie par l'objectif thérapeutique souhaité<sup>(34)</sup>. La distribution et la pharmacocinétique (PK) des LNP, sont en outre influencées par la taille des particules et la voie d'injection. Tous ces paramètres sont à définir en fonction de l'objectif thérapeutique<sup>(35)</sup>.

## **4.2. Les polymères/ les polyplexes**

Le deuxième type de vecteur le plus utilisé et le plus étudié sont les polymères. Ce sont des macromolécules formées par l'enchainement de monomères. En comparaison aux lipides, les polymères font face à des défis supplémentaires liés à leurs caractéristiques physico-chimiques<sup>(36)</sup>.

### **4.2.1. Structures des polymères**

Les polymères sont des molécules bien connues, et sont employés dans diverses industries pour leur capacité de synthèse illimitée, leur polyvalence de structure ainsi que pour leur stabilité<sup>(20)</sup>. La formation de polymères résulte d'une association de plusieurs monomères par polymérisation qui est le plus souvent catalysée par une enzyme. Deux types de polymères sont principalement utilisés dans la formation de nanoparticules. On distingue les polymères « branchés » et les polymères « linéaires ».

### **4.2.2. Les polyplexes**

Les polyplexes sont une forme simple de transporteur d'acides nucléiques. Ils sont généralement de forme sphérique et engagent des liaisons avec les ARNm via des interactions électrostatiques.

#### **a) Les PEI : poly(éthylèneimine)**

La poly(éthylèneimine) (PEI), est une polyamine cationique largement utilisée pour la délivrance d'ARNm. Ses fortes propriétés cationiques contribuent à une rupture et un échappement endosomale efficace. De plus, les PEI possèdent des effets immunostimulants, tels que l'activation et le recrutement des cellules dendritiques et l'induction de la production de cytokines<sup>(37, 38)</sup>.

Cependant cette classe s'accompagne d'une biocompatibilité médiocre, en raison de la charge cationique importante et d'un poids moléculaire élevé (environ 25kDa). De plus ces structures présentent un manque de liaisons biodégradables. La densité de charge élevée due à la présence d'ions ammoniums serait aussi à l'origine de l'apparition des réactions toxiques et inflammatoires *in vivo*, ce qui limite d'autant plus les applications cliniques<sup>(37)</sup>.

Des modèles de toxicité in vitro sont essentiels pour anticiper la sécurité des polyplexes in vivo. Le réglage de la dose et du poids moléculaire, l'introduction de liaisons disulfures biodégradables et l'amélioration de la surface des PEI sont importants pour abaisser la toxicité. Des recherches quant à l'addition d'autres composés pour réduire la toxicité sont donc en cours de développement.

### b) Poly acides-aminés

Les poly acides-aminés sont utilisés en raison de la diversité de structures des acides aminés. Ainsi, une large gamme de poly acides-aminés ou polypeptides peut être facilement synthétisée. L'avantage de cette large gamme est de permettre la construction de structures plus ou moins ramifiées afin de faire varier la charge et le poids moléculaire pour optimiser la délivrance des ARNm<sup>(39)</sup>. De surcroit, la présence de fragments d'acides aminés dans la structure semble bénéfique pour la solubilité, la biocompatibilité et la biodégradabilité des polymères.

Les polymères à base de lysine sont souvent utilisés. Récemment, des études ont mis en évidence que la polylysine associée à des résidus d'histidine peut améliorer l'absorption cellulaire du polymère, en modifiant la taille et la charge des polymères<sup>(40)</sup>. Les lysines ne sont pas les seuls acides aminés utilisés. Il est possible de trouver des acides aminés tels que : l'aspartate, la L-ornithine... qui participent à la réduction de la toxicité du polyester<sup>(38)</sup>.

### c) Polyesters

Le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) a été utilisé dans de nombreuses formulations de médicaments à action prolongée. Ce dernier, est un polyester approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis<sup>(40)</sup>. Les PLGA sont des copolymères linéaires, préparés au moyen de deux constituants : l'acide lactique (LA) et l'acide glycolique (GA).

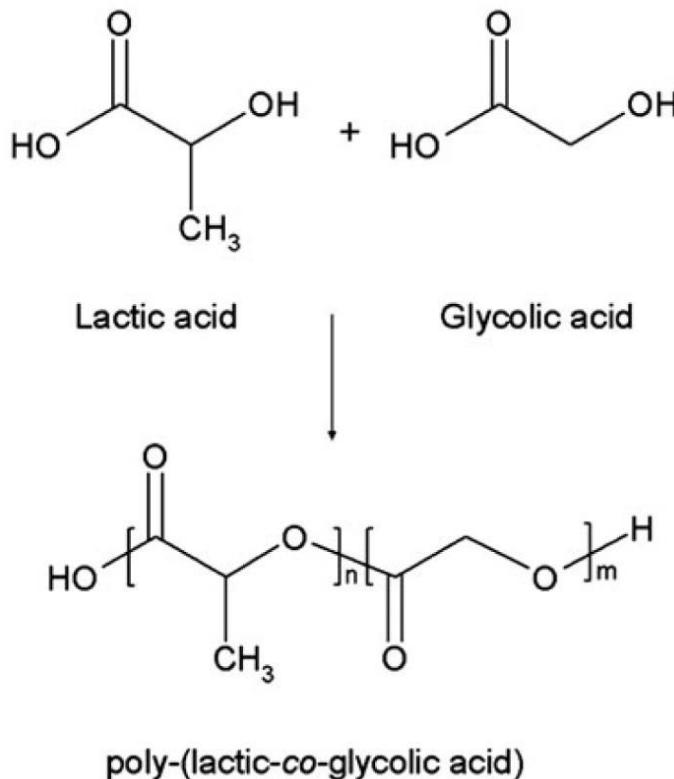


Figure 7: Formation des PLGA<sup>(41)</sup>

Leur utilisation pour la délivrance d'ARNm semble être intéressante, en raison de leur bonne biodégradabilité. En effet, les monomères qui constituent les PLGA sont reliés par des liaisons ester qui sont facilement dégradables par hydrolyse (*Figure 7*).

Dans cette même catégorie, les PBAE (poly( $\beta$ -amino ester)) sont aussi en cours de test. Les propriétés chimiques telles que le poids moléculaire, l'hydrophobicité, la dégradabilité et la structure linéaire ou ramifiée des PBAE peuvent être exploitées pour améliorer les systèmes de délivrance<sup>(42)</sup>. De plus, la préparation des PBAE s'effectue via des réactions chimiques peu coûteuses comme la réaction d'addition de Michael ou des réactions de polymérisation par ouverture du cycle. Cela permettrait à l'avenir une production à grande échelle. Des bibliothèques formées à partir de tests à haut débit peuvent aussi être utilisées pour identifier les polymères qui présentent une efficacité élevée et une faible toxicité pour la délivrance d'acides nucléiques<sup>(42)</sup>. La force de liaison entre le PBAE et l'acide nucléique peut également être ajustée en utilisant différentes coiffes d'extrémité sur la structure du PBAE<sup>(43)</sup>. La présence d'amines secondaires semble améliorer la délivrance des acides nucléiques, de plus la nature

du groupement terminal conditionne largement la taille de la nanoparticule. Enfin, la présence d'amines tertiaires améliore la capacité tampon à faible pH et facilite l'échappement endosomal<sup>(44)</sup>.

#### d) La protamine

La protamine est un polymère capable de condenser l'ARN à travers des domaines d'ancrage riches en arginine<sup>(44)</sup>. En raison de sa nature cationique, la protamine s'associe spontanément et de manière non spécifique aux molécules d'ARNm. De plus l'association est favorisée par le changement de structure de la protamine en présence d'ARNm. Leur conformation en forme de bobine se transforme en structure hélicoïdale<sup>(46)</sup>. La protamine permet alors la formation de particules allant de 50 à 1000nm, selon les besoins.

Malgré tout, la protamine reste une molécule hydrophile, ce qui limite la traversée des membranes cellulaires. De plus, les caractéristiques physico-chimiques de la protamine ne permettent pas un échappement endosomal suffisant. C'est pourquoi la protamine est toujours associée à d'autres molécules, comme les dérivés de poly-(acide acrylique). Ces molécules possèdent des structures chimiques qui agissent comme des agents déstabilisateurs d'endosomes. L'ajout de ces dérivés améliore l'efficacité de transfection du complexe protamine-ARNm.

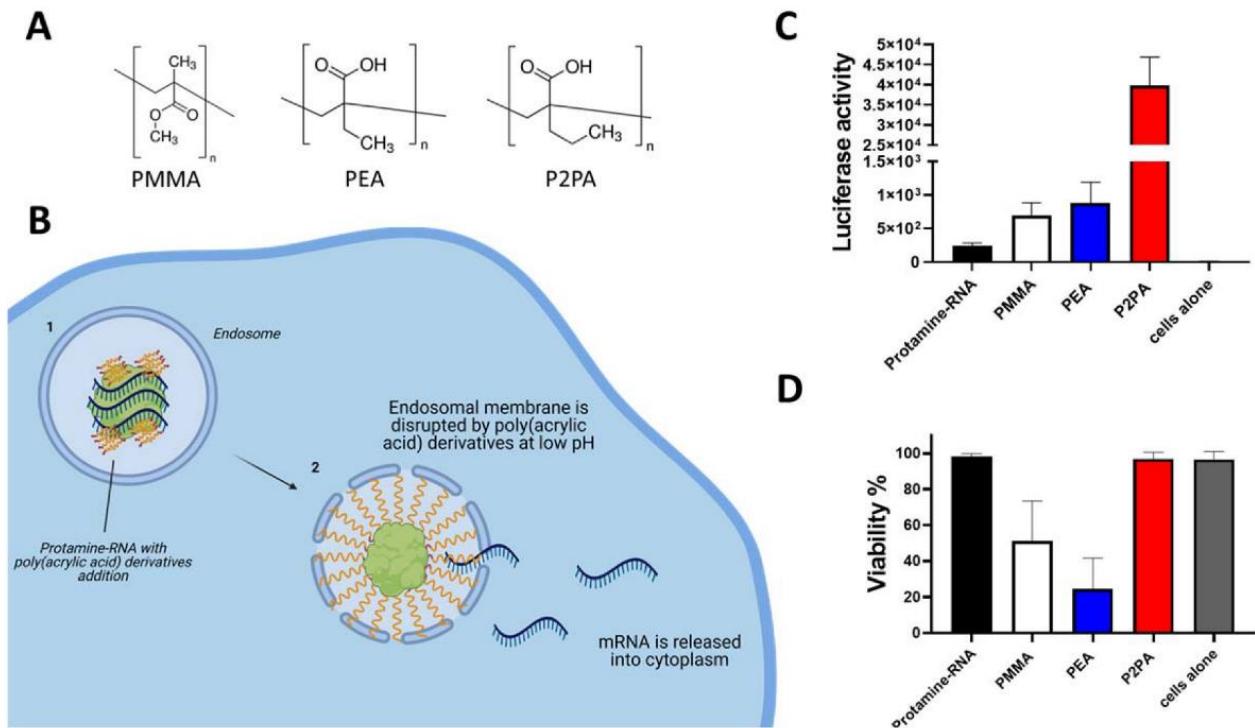


Figure 8: Influence sur l'efficacité et la toxicité de trois poly(acide acrylique)<sup>(46)</sup>

Cette figure montre qu'en fonction des poly(acide acrylique) choisi, l'efficacité et la toxicité pour les cellules varient. Ici, trois structures ont été comparées ; le poly(acide 2-éthyl acrylique) (PEA), le poly(acide 2-propyl acrylique) (P2PA) et le polyméthacrylate de méthyle-co-acide méthacrylique (PMMA). Il semble que le P2PA soit le plus efficace dans l'amélioration de la transfection cellulaire, de plus il n'a pas présenté de toxicité cellulaire. À ce jour, la protamine est en cours d'étude dans la formulation de nombreux vaccins contre le cancer (mélanomes, cancer de la prostate, cancer des poumons non à petites cellules...)<sup>(46)</sup>.

Plusieurs points restent encore à améliorer, car l'utilisation de la protamine est associée à un certain nombre d'effets secondaires. Ceci à cause de l'activation : du complément, de la libération d'histamine, de l'inhibition de la carboxypeptidase, de la production de thromboxane, d'oxyde nitrique et d'anticorps<sup>(47)</sup>.

### e) Polymères sous forme d'hydrogel

Les hydrogels sont composés en réseau tridimensionnel. L'intérêt des hydrogels est de pouvoir encapsuler des adjuvants ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, ce qui permet de renforcer l'immunogénicité et de recruter des cellules dendritiques et des cellules T au site d'injection. L'intérêt de la forme hydrogel est de limiter le passage systémique de l'ARNm, ce qui peut être une proposition retenue pour le développement de vaccin actif en intratumoral<sup>(48)</sup>.

En effet, cette stratégie pourrait permettre le recrutement des lymphocytes au niveau des tumeurs, et donc de pouvoir soutenir de manière plus efficace un traitement de chimiothérapie. Les hydrogels sont formés à partir de polymères réticulés par des réactions chimiques ou physiques ou par méthode des rayonnements ionisants. Ensuite les hydrogels sont répartis en plusieurs classes :

Les homopolymères, qui sont formés à partir d'un seul type de monomère. Les réseaux copolymériques formés à partir de deux ou plusieurs monomères, dans ce cas la présence d'au moins un monomère hydrophile est nécessaire pour obtenir la capacité de gonflements des hydrogels. Enfin, les réseaux multi polymériques, sont formés à partir de deux polymères réticulés indépendants. (Figure 9)

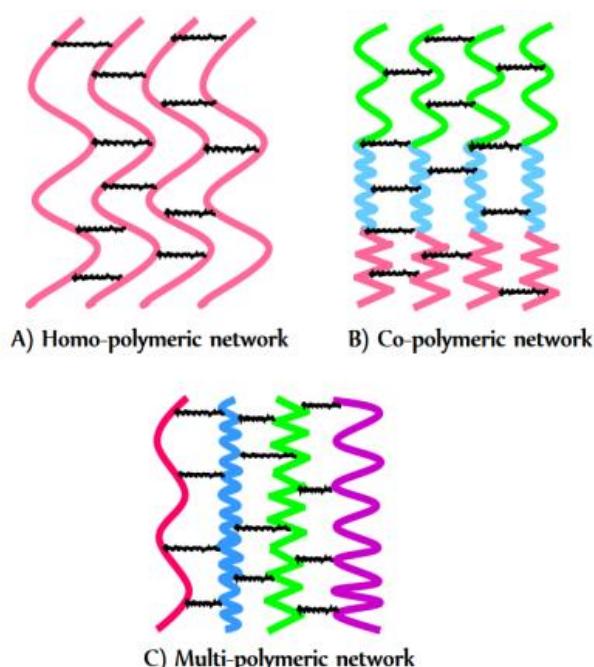


Figure 9: présentation des différents types d'hydrogels<sup>(48)</sup>

Les polymères utilisés peuvent être des polymères naturels, car ils ont l'avantage de la biocompatibilité de la biodégradabilité. Leur utilisation est parfois limitée à cause de leur forte variation d'un lot à l'autre. Les polymères naturels principalement utilisés sont : le chitosan, l'acide hyaluronique, l'acide alginique, le collagène, carraghénane.

Les polymères synthétiques majoritairement utilisés sont ceux vu précédemment : poly éthylène glycol (PEG), poly acide lactique (PLA), l'acide co-glycolique polylactique (PLGA), alcool polyvinyle (PVA), polycaprolactone (PCL). Enfin des polymères hémisynthétiques dérivés de celluloses peuvent être utilisés<sup>(49)</sup>.

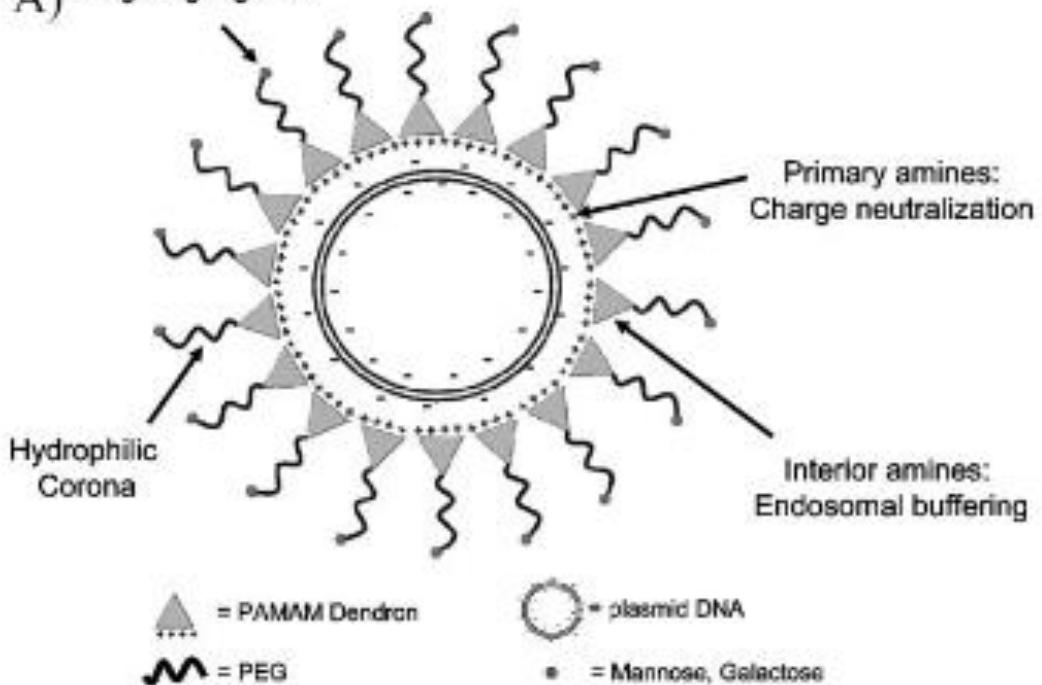
#### **4.2.3. Structures particulières : les dendrimères**

Les dendrimères sont des macromolécules qui se distinguent par leur structure tridimensionnelle. Contrairement aux polymères linéaires, les dendrimères possèdent un nombre de branches terminales. Le pilier très ramifié confère aux dendrimères une forme sphérique qui leur permet d'encapsuler d'autres substances<sup>(50)</sup>.

La forme, les cavités centrales et les groupes fonctionnels de surface sont à la base de la différenciation des dendrimères. La taille et la masse moléculaire des dendrimères peuvent être modulées lors de leur synthèse. Ces polymères peuvent être associés à d'autres structures afin d'améliorer leur profil pharmacocinétique. Par exemple la surface des dendrimères peut être améliorée par l'ajout de PEG (polyéthylène glycol) afin d'améliorer leur stabilité.

Comme, les polymères cationiques, les dendrimères possèdent une charge cationique qui leur permet de former des interactions électrostatiques avec l'ARNm. Parmi les dendrimères synthétisés à ce jour, les principales classes que l'on peut citer sont : la polyamidoamine (PAMAM), la poly-L-lysine (PLL), et polypropylèneimine (PPI). (*Figure 10*)

A) Targeting Ligands



B)

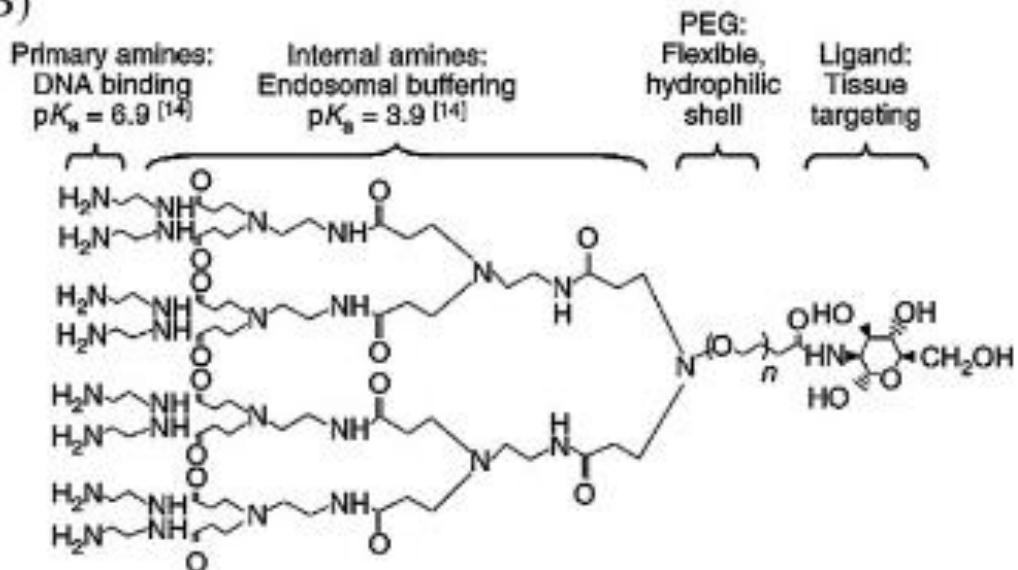


Figure 10: Exemple de dendrimère : PAMAM-PEG-Mannose<sup>(50)</sup>.

Récemment, des systèmes de délivrance à base de dendrimères ionisables ont été utilisés dans la production des vaccins contre le coronavirus<sup>(52)</sup>. Ces derniers sont composés d'un grand nombre de groupes chargés positivement. Ils sont capables de se lier et de condenser efficacement les acides nucléiques en des formes plus compactes. Ces polymères peuvent être améliorés grâce à l'ajout de ligand. Par exemple, l'ajout de mannose s'avère intéressant pour améliorer l'absorption par les cellules dendritiques. L'ajout de nanoparticules magnétiques est aussi possible lors de formulation de thérapies anticancéreuses. L'utilisation de composites magnétiques modifiés par un dendrimère permet, dans certains cas, l'inhibition de la croissance des cellules tumorales<sup>(50)</sup>. L'ajout de nanoparticules d'or ou d'acide folique modifié est aussi possible, il permet de pénétrer efficacement les cellules via les récepteurs correspondants.

Cependant les dendrimères présentent eux-aussi une toxicité. Celle-ci s'explique en raison de leur charge cationique élevée et de la présence de groupes amines, qui peuvent endommager la membrane cellulaire, y compris celles des érythrocytes. Les dendrimères anioniques contenant des groupes R-COOH (acide carboxylique) et R-OH (hydroxyle) sont moins toxiques que les cationiques. Une étude des dendrimères PAMAM, avec des groupes amines terminaux, sur des animaux de laboratoire a montré que leur toxicité augmentait avec le nombre de générations d'amines, la charge cationique et dépendait également de la dose de dendrimère administrée<sup>(53)</sup>.

Afin d'améliorer la sécurité des dendrimères, des modifications de surface sont possibles. Par exemple avec l'ajout de molécules biomimétiques telles que le PEG (polyéthylène glycol) ou des bio macromolécules (peptides, anticorps, protéines, etc.). Ces molécules sont impliquées à la fois dans le masquage de la toxicité du complexe et dans le ciblage du dendrimère vers la cible appropriée<sup>(53)</sup>.

#### **4.2.4. Les polymères : quelques applications en cours d'études :**

Deux études récentes ont montré que le polymère cationique PEI pouvait être condensé avec l'ARNm codant pour le gag ou la gp120 (antigène du VIH-1) afin de produire des anticorps spécifiques. Ces études ont été menées via deux voies différentes : l'une par injections sous-cutanée et l'autre par voie intranasale. L'application clinique des complexes ARNm à base de PEI est cependant limitée par des problèmes de sécurité et de toxicité<sup>(20, 54, 55)</sup>.

Par ailleurs des thérapeutiques à base de polymères biodégradables sont aussi en cours d'étude. Récemment, des PBAEs hyperbranchés ont été utilisés pour stabiliser les nano formulations conçues pour permettre la délivrance d'ARNm à l'épithélium pulmonaire par inhalation<sup>(56)</sup>. Ces vecteurs ont pu transfecter 25% de l'endothélium pulmonaire lorsqu'ils ont été nébulisés et inhalés chez des souris, sans toxicité évidente et avec des niveaux d'expression 10 fois supérieurs à ceux du PEI branché<sup>(57)</sup>.

#### **4.2.5. Les améliorations et contraintes**

La toxicité éventuelle des polymères ainsi que leur stabilité variable sont aussi des problématiques à résoudre pour étendre leur utilisation. L'utilisation de nouveaux polymères est alors à prévoir dans le futur. De nouvelles organisations des polymères sont aussi à l'étude. Par exemple, des polymères sous forme de micelles sont étudiés pour améliorer la sécurité des vaccins ARNm. On peut citer également la formation de micelles polymériques auto-assemblées. Ces micelles fabriquées à partir de copolymère de polyéthylèneimine et de succinate de vitamine E (PVES) modifiée ont permis de réduire la cytotoxicité par rapport aux PEI<sup>(58)</sup>.

L'apparition de nouveaux vecteurs, tels que les nano-hydrogels sont aussi en cours de développement pour une application *in vivo* future. L'intérêt sera de permettre la livraison à libération prolongée d'ARNm aux cellules<sup>(59)</sup>.

La synthèse de polymères complexés avec d'autres polymères peut aussi modifier la relation structure-activité et par conséquent améliorer ou non l'efficacité de l'encapsulation d'ARNm. Dans ce cas il faut tenir compte de la densité cationique et du poids moléculaire de chaque polymère (*Figure 11*).

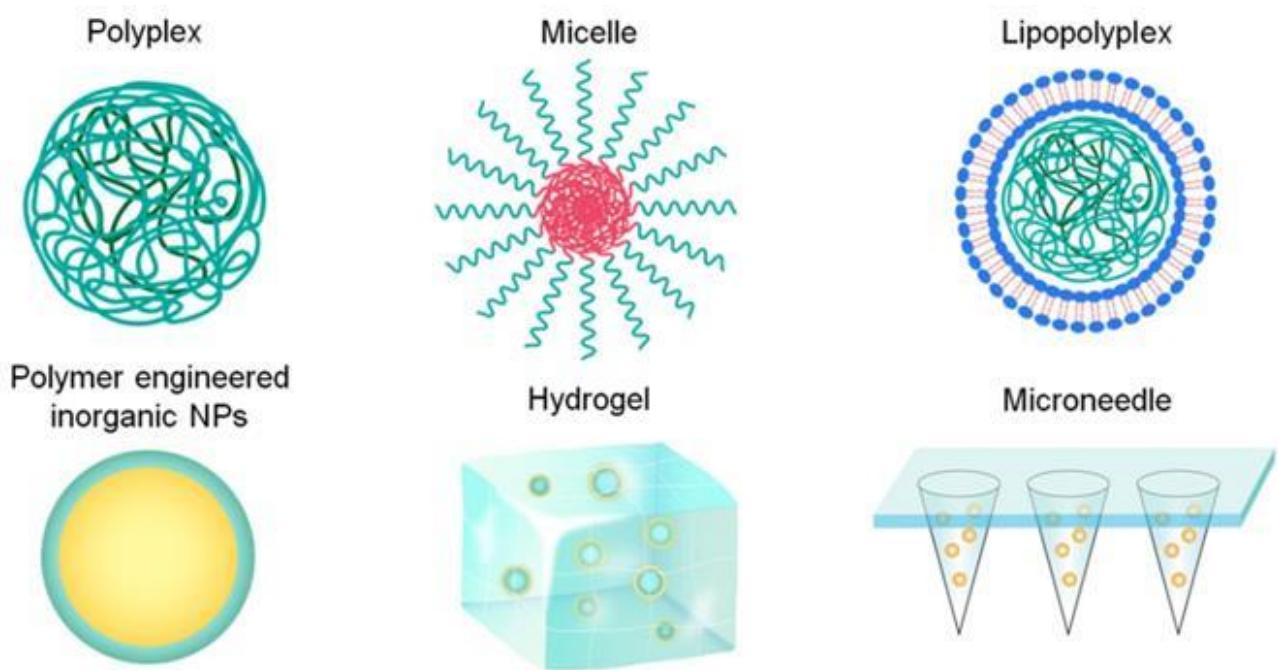


Figure 11: Récapitulatif des différents agencements des polymères<sup>(38)</sup>

### 4.3. Les lipopolyplexes

Les lipopolyplexes sont des complexes formés à partir des deux grandes classes précédemment étudiées : les lipides et les polyesters<sup>(60)</sup>. Cette association permet de privilégier les avantages de chaque classe (*Figure 12*).

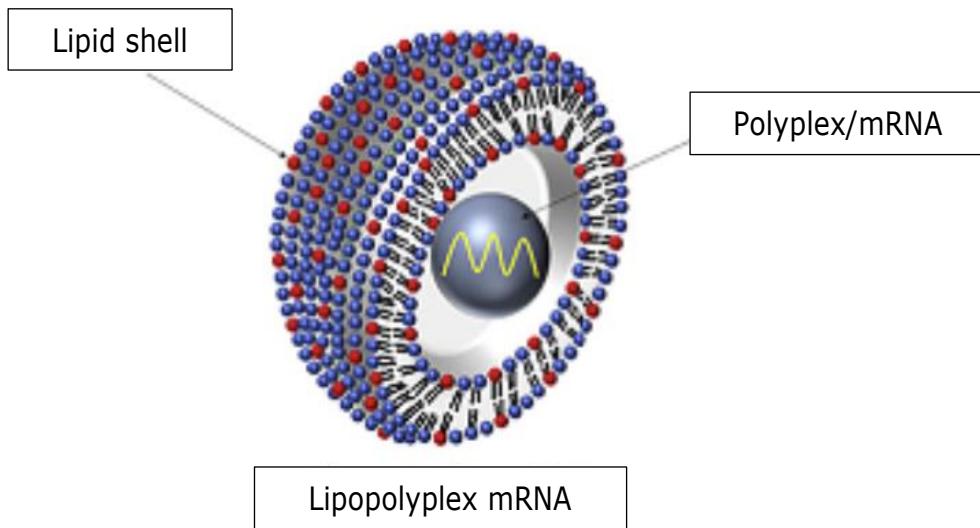


Figure 12: Structure schématisée d'un lipopolyplex<sup>(61)</sup>

Les lipides et les polymères peuvent exercer des effets synergiques qui favorisent l'absorption cellulaire et donc facilitent l'échappement endosomal de la charge utile. Plusieurs polymères et lipides ont été étudiés pour la formulation de lipopolyplexes stables.

Plusieurs polymères biodégradables, tels que la polycaprolactone, le PLGA et l'acide polylactique, les PEI, poly-L-lysine (PLL), sont utilisés dans la complexation avec l'ARNm. En ce qui concerne les lipides, DSPE, DOTAP, lécithine, 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine, et le 1,2-dilauroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine sont les lipides les plus couramment utilisés<sup>(62)</sup>.

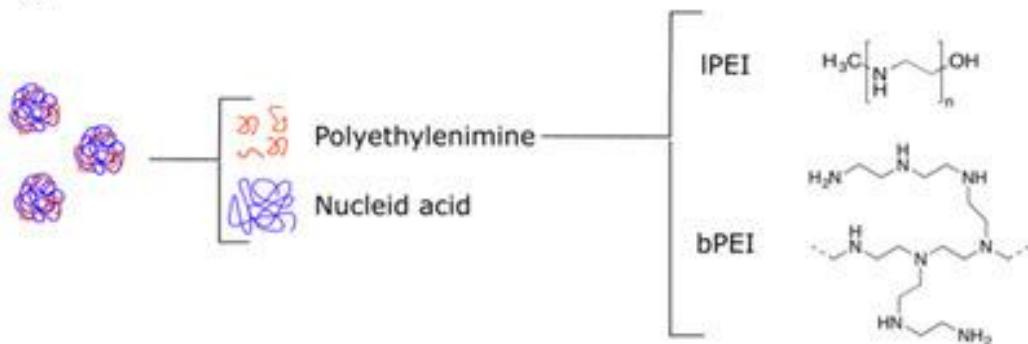
#### 4.3.1. La structure

Les lipopolyplexes sont des complexes ternaires liés par des liaisons non covalentes. Cela comprend : les lipides cationiques, les poly-cations (polymères ou peptides cationiques), et les acides cationiques<sup>(63)</sup>.

Les lipopolyplices multi compartimentaux permettent l'incorporation d'antigènes de natures chimiques diverses. Des molécules hydrophobes peuvent être placées dans la bicouche lipidique lors de la formation des liposomes, et des molécules hydrophiles peuvent être piégées dans le compartiment liposome aqueux. Les LPP peuvent alors transporter des plasmides codant pour des adjuvants, tels que des cytokines immunostimulantes, des facteurs chimiotactiques ou d'autres antigènes protéiques<sup>(64,65)</sup>.

Le polymère le plus étudié dans la formulation de lipopolyplices est le PEI. Bien que l'utilisation clinique du PEI soit entravée à cause de sa cytotoxicité, ce dernier reste très intéressant pour la délivrance d'ARNm. À cet égard, de nombreuses approches ont été développées pour réduire la toxicité cellulaire du PEI. Ainsi, le LPP contenant du PEI chimiquement modifié semble exploiter à la fois les propriétés avantageuses des adduits chimiques du PEI et les effets synergiques des liposomes (*Figure 13*).

(a) Polyplex



(b) Lipopolyplex

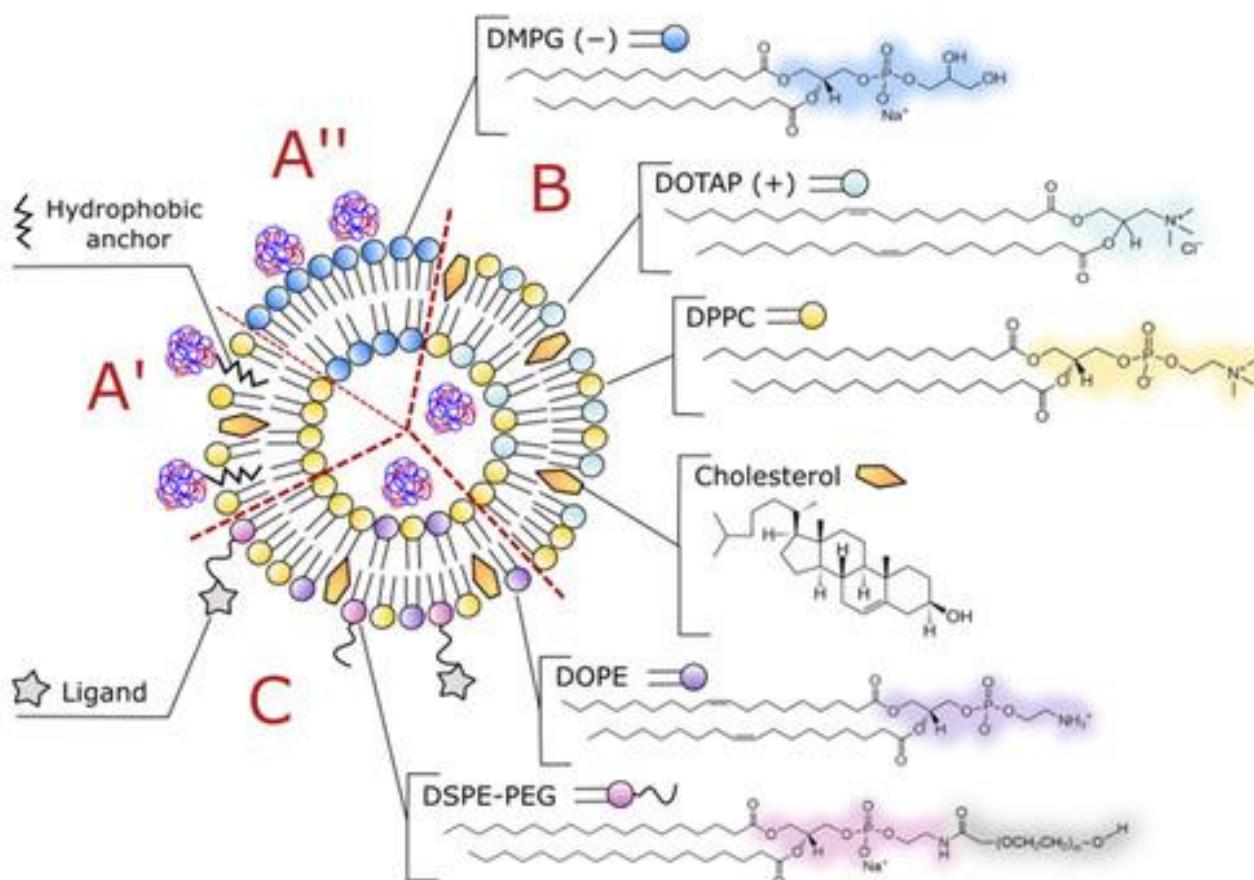


Figure 13: Exemple de structure des Lipopolyplexes à base de PEI<sup>(64)</sup>

La première étape de formation est la synthèse du polyplex PEI/ARNm. Il est possible de trouver des PEI linéaires (IPEI) ou branchés (bPEI). Dans un second temps ces polymères sont associés aux liposomes. Ici, plusieurs structures de LPP sont présentées<sup>(64)</sup>. Les entités polymères des LPP classiques, condensant l'acide nucléique, sont principalement situées au cœur des LPP tandis que les LPP inverses ont leur composant polymère à leur surface.

Les sections A représentent les « lipopolyplices inversés ». La section A' représente le complexe avec un PEI lié de manière covalente à un ancrage hydrophobe. La section A'' représente un lipopolyplice inversé composé de lipides anioniques qui permettent l'amarrage de PEI chargé positivement. La section B représente un lipopolyplice « classique » composé de lipides cationiques. Dans le cas A et B la surface des complexes est toujours chargée positivement afin de favoriser l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement. Les LPP inverses ont montré un temps de circulation plus long et une meilleure libération endosomale en raison de la capacité d'éponger à protons du PEI. Certaines des ancre (acétonide de triamcinolone) se sont montrées bifonctionnelles, ce qui ancrerait non seulement le PEI dans la bicouche liposomale, mais facilitait également le transport nucléaire du matériel génétique. Enfin, l'ajout de PEI permet l'utilisation de liposomes anioniques qui ont une stabilité *in vivo* plus élevée et une cytotoxicité moindre que les liposomes cationiques. Pour être effectifs, ces complexes ont besoin d'être stabilisés par des poly électrolytes et être formulés dans des conditions de PH adéquat. Tandis que les lipopolyplices classiques ont été étudiés de manière plus approfondie, les lipopolyplices inversés sont relativement nouveaux et nécessitent davantage de recherche pour comprendre pleinement leurs mécanismes et optimiser leur composition. La stabilité à long terme, la spécificité du ciblage, et la libération contrôlée du matériel génétique restent des défis pour les deux types de systèmes<sup>(63)</sup>.

Enfin la section C représente des LPP avec des ligands de ciblage : anticorps, transferrine, aptamères... Ces ligands sont amarrés aux lipides via des PEG et permettent de cibler spécifiquement certains antigènes à la surface des cellules sans interférer avec la structure des polyplexes. Le ciblage actif permet de réduire la cytotoxicité pour les cellules « normales », tout en améliorant la cinétique d'internalisation. L'utilisation de cette forme présente un intérêt dans le ciblage de cellules cancéreuses d'un phénotype donné<sup>(64)</sup>.

#### **4.3.2. Etudes en cours**

Le développement de vaccins à base de lipopolyplices est au cœur de nombreuses recherches. Leur utilisation contre la covid19 a permis d'induire une immunogénicité robuste chez les souris. Ce vaccin a permis de montrer que la structure « noyau-coquille » des Lipopolyplices permet une meilleure absorption du vaccin et améliore la stabilité<sup>(66)</sup>.

Par ailleurs cette structure des LPP est majoritairement employée dans le domaine de l'oncologie. Récemment un vecteur lipopolyplexe (multi-LP), incorporant l'adjuvant immunitaire  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) et un lipide cationique multivalent, a été proposé pour l'administration *in vivo* d'ARNm dans des cellules présentatrices d'antigène. Ces nanoparticules multi-LP chargées d'un ARNm ont conduit à une expression élevée de la protéine d'intérêt *in vivo* et *in vitro*. De plus elles ont présenté une sélectivité intrinsèque pour les cellules dendritiques<sup>(67)</sup>.

Récemment un système similaire composé d'un complexe protamine-ARNm encapsulé dans des liposomes cationiques DOTAP/Chol/DSPE-PEG a vu le jour. Le système liposome ARNm-protamine-cationique a favorisé l'absorption du vaccin par les cellules dendritiques. Cette formulation a également montré des capacités plus fortes à stimuler des cellules dendritiques et à favoriser la sécrétion de cytokines, conduisant à une puissante réponse immunitaire antitumorale. Des études *in vivo* ont montré que l'administration intranasale du système liposome ARNm-protamine-cationique est capable de provoquer une forte réponse immunitaire cellulaire et de ralentir la croissance tumorale dans un modèle agressif de carcinome pulmonaire de Lewis<sup>(68)</sup>.

Des vaccins développés à partir de lipopolyplices histidylés ont aussi fait l'objet d'étude. Ces derniers sont constitués de liposomes cationiques histidylés et de polymères riches en histidine PEGylés pour l'administration de vaccins à ARNm contre le mélanome. L'injection intraveineuse de cet ARNm codant pour les lipopolyplices histidylés MART1 a conduit à une protection spécifique et significative contre la progression tumorale du mélanome B16F10 et à une réduction de la formation de métastases pulmonaires chez la souris<sup>(68)</sup>.

#### **4.4. Adjuvants et nanoparticules**

Comme pour la formulation des vaccins classiques, l'introduction d'adjuvants reste possible afin d'augmenter la réponse immunitaire et favoriser l'inflammation. Ces adjuvants doivent produire une réaction inflammatoire limitée dans le temps et dans l'espace afin de réduire les effets indésirables potentiels. Ils peuvent être associés ou non à la structure du vecteur. Parfois même le vecteur peut jouer le rôle d'adjuvant ; par exemple les lipoplexes qui possèdent une activité adjuvante intrinsèque<sup>(3, 69)</sup>.

#### **4.5. Systèmes de « ciblage actif »<sup>(70)</sup>**

Afin d'exploiter tout le potentiel des médicaments à base d'ARN est de délivrer l'ARN de manière ciblée dans des organes et les tissus spécifiques, il est possible d'avoir à un système de « ciblage actif ». Dans cette stratégie, un ligand qui se lie à une biomolécule spécifique est ajouté au système de délivrance.

Les nano-vecteurs de nouvelle génération peuvent inclurent des motifs de ciblage spécifiques pour l'orientation et l'absorption par des cellules professionnelles présentant des antigènes, telles que les cellules dendritiques (CD). Des ligands spécifiques des récepteurs des cellules dendritiques pourraient être intégrés à la surface des vecteurs afin de cibler ces cellules et de promouvoir la présentation d'antigènes au système immunitaire. C'est ce que l'on appelle le ciblage actif (*Figure 14*)<sup>(70)</sup>. La surface d'un vecteur peut être décorée avec des séquences de ciblage spécifiques qui facilitent la localisation et l'absorption ultérieure. Les LNP peuvent même être formulés simultanément avec plusieurs antigènes, facteurs de signalisation et adjuvants pour des applications sur mesure.

Par exemple des « nanoparticules de ciblage sélectif d'organes » appelés : « SORT » sont en cours d'étude. Les particules SORT impliquent l'adsorption de protéines distinctes à la surface des LNP pour former des couronnes de protéines uniques afin de cibler les organes d'intérêt<sup>(71)</sup>. Par ailleurs, elles influencent la bio distribution et le pKa de la structure.

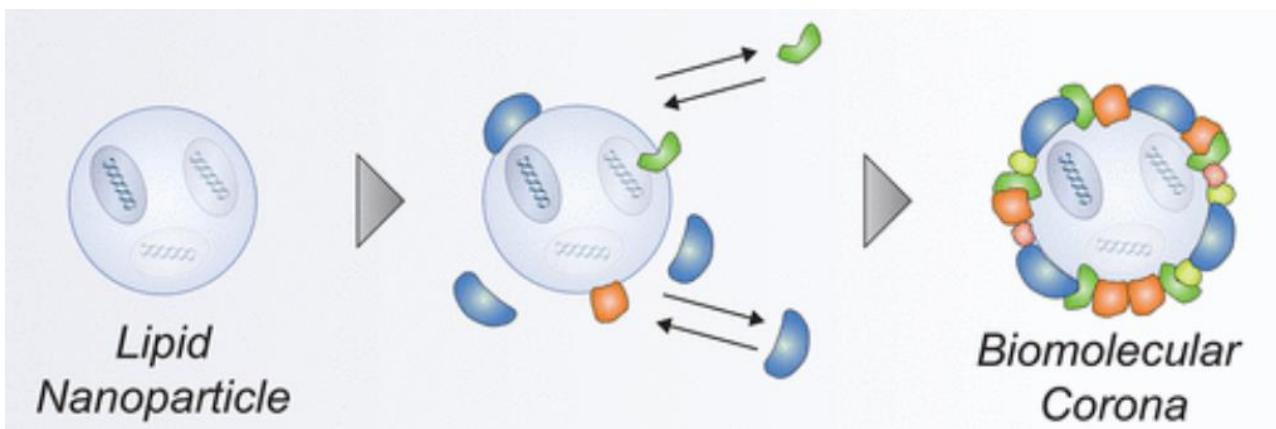


Figure 14: Exemple de couronne à la surface des LNP<sup>(72)</sup>

#### 4.5.1. Ciblage hépatique

L'apolipoprotéine E (ApoE), entre autres protéines, adsorbée à la surface du LNP permet un ciblage spécifique des hépatocytes<sup>(71)</sup>. Par interaction avec le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) situé dans ces cellules. Ensuite, le ligand N-acétylgalactosamine (GalNAc) attaché de manière covalente au LNP pouvait également cibler les hépatocytes via le récepteur de l'asialoglycoprotéine.

Des médicaments ont déjà été approuvés par l'EMA. Ces derniers étaient formulés à partir de GalNAc est un ligand trivalent dérivé des glucides qui se lie au récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR). L'ASGPR est un récepteur idéal pour le ciblage actif : il est fortement exprimé sur les cellules cibles (dans ce cas les hépatocytes).

#### 4.5.2. Ciblage non hépatique<sup>(73)</sup>

Le choix des LNP dans la composition vaccinale permettra d'orienter l'ARN vers les organes cible. Par exemple : l'inclusion de lipides neutres dans le LNP a entraîné un tropisme hépatique après une injection intraveineuse, tandis que l'ajout de lipides cationiques au LNP neutre a entraîné un déplacement vers l'absorption pulmonaire et l'ajout de lipides chargés négativement au LNP neutre net a entraîné une absorption splénique.

Afin d'améliorer l'efficacité des vaccins et de réduire les potentiels effets indésirables, il faut améliorer la distribution des LNP vers les ganglions lymphatiques et les cellules présentatrices d'antigènes. Il a d'ailleurs été identifié que les LNP de petites tailles chargées négativement présentent une meilleure distribution vers les cellules dendritiques.

Le ciblage actif permet de mieux cibler les organes cibles. Des études sur l'incorporation de mannose conjugué aux molécules de cholestérol des LNP a permis de montrer un meilleur ciblage des cellules présentatrices d'antigènes en ciblant leurs récepteurs aux mannose. Cela entraîne une augmentation de l'absorption des cellules primaires dendritiques *in vitro* et une réponse immunitaire plus rapide *in vivo*. Des LNP conjugués au mannose ont été utilisés pour immuniser des souris contre le H1N1<sup>(74)</sup>.

Des anticorps anti-CD4 conjugués à la surface des LNP ont aussi été évalués pour améliorer l'absorption par les lymphocytes T. Le revêtement d'anticorps à la surface du LNP incorporant un lipide de liaison au Fc a permis le ciblage *in vivo* de diverses cellules immunitaires, notamment les macrophages, les Treg, les T helper, les CTL, les cellules B et les monocytes. Les revêtements ont été évalués avec les anticorps anti-CD45, -CD25, -Anticorps CD4, -CD8, -CD19 et -CD11b.

Pour le ciblage des tissus pulmonaires, la voie d'administration permet de mieux cibler les voies aériennes (aérosol, nébulisation...). Le ciblage actif joue aussi un rôle important. La conjugaison d'anticorps de la molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1 (PECAM-1) à la surface du LNP à améliorer le ciblage vers le système pulmonaire.

En oncologie, le ciblage actif permet un meilleur ciblage du site cancéreux. En effet, après l'étude des antigènes majoritairement exprimés par la tumeur, des ligands peuvent être sélectionnés afin de diriger le vaccin vers le site cancéreux.

#### **4.5.3. Les difficultés**

Bien qu'il ait été démontré que l'inclusion de ligands de ciblage améliore l'administration et l'efficacité thérapeutique des ARNm-LNP, il convient de noter que la fixation de fragments de ciblage peut ajouter de la complexité, des coûts et des difficultés réglementaires au processus de fabrication des systèmes de délivrance ARNm.

De plus, la spécificité de ciblage de certains ligands peut disparaître lorsque les nanoparticules sont exposées aux fluides biologiques. Une interaction entre les protéines endogènes et les ligands peut se produire et former un amas de protéines autour du vecteur, le rendant inefficace. Un compromis entre les avantages cliniques possibles, la complexité et le coût de la fabrication « ciblée » doit être pris en considération<sup>(75)</sup>.

## 5. Exemple de vecteurs utilisés pour transporter les ARNm

**Table 2.** Nonviral DNA vaccine delivery systems.

Formulation	Clinical indication	Admin.	Status
<b>Lipid-based platforms</b>			
GAP-DMRIE:DPyPE and GAP-DLRIE:DOPE cationic liposomes (Vaxfectin <sup>®</sup> )	Tuberculosis, Anthrax	IM, IN[a]	Vical, pre-clinical
DOTMA/cholesterol cationic mannosylated liposomes	Melanoma	IP, IV	Pre-clinical
DOTIM/cholesterol cationic liposomes	Lung tumor	IV, IM, ID	Pre-clinical
DODAC/DOPE cationic liposomes	Influenza virus	IN, IM	Pre-clinical
Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes)	HBV	Topical, Oral	Pre-clinical
<b>Polymeric microparticle-based platforms</b>			
Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)	HIV	IM	Novartis, phase I
PLGA (amolimogene/ZYC101a)	Solid tumors	IM	Pre-clinical
PLGA w/cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	HPV cervical neoplasia	IM	MGI pharma, phase II/III
PLGA microspheres w/PEI nanoparticles	Measles virus	IM	Pre-clinical
PLGA w/PEI coating	FMDV	ID, IM, IN	Veterinary use
PLGA w/PBAE	HCV	IM	Pre-clinical
Poly(ortho ester) microspheres (POE)	Model antigens	Oral, IM	Pre-clinical
Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres w/gelatin nanoparticles	B-cell lymphoma	ID, IM	Pre-clinical
Reporter system	Tumor antigen	ID	Pre-clinical
Reporter system	Tumor antigen	ID	Pre-clinical
Reporter system	Reporter system	Oral	Pre-clinical
<b>Polymeric nanoparticle-based platforms</b>			
Chitosan	Reporter system	Oral	Veterinary
Poly-L-lysine (PLL)	Allergy, RSV, tuberculosis	IN, oral, pulm.	Pre-clinical
PLL-coated polystyrene	HIV	ID	Pre-clinical
Poly( $\beta$ -amino esters) (PBAE)	Model tumor antigen	ID	Pre-clinical
Linear-dendritic PAMAM	Reporter system, HIV	IM	Pre-clinical
Poly(ethylenimine)-mannose (PEI-man) (DermaVir patch)	Reporter system	—	Pre-clinical
Poly(methylmethacrylate) (PMMA)/PEG	HIV	Transdermal	Genetic immunity, phase I/II
Poloxamer-based (CRL1005)	HIV	IM	Pre-clinical
CMV	IM	Vical, phase I	
<b>Other platforms</b>			
DNA tattooing	Influenza virus	ID	Pre-clinical
IM electroporation (EP)	HIV	IM	Pre-clinical
Gene-gun delivery of gold particles	HPV, tumor antigens	ID	Pre-clinical
Intraoral jet-injections	HIV	Oral	Pre-clinical

Figure 15: Exemple de vecteurs en cours d'études et leurs indications<sup>(51)</sup>

## 6. Conclusion : les vecteurs<sup>(68)</sup>

Le développement de vaccins à base d'ARNm utilisant des systèmes de nano administration se heurte à de nombreux obstacles, tels que le poids moléculaire élevé de l'ARNm, la charge négative de l'ARN, et l'instabilité intrinsèque. Aujourd'hui les vecteurs ont largement démontré leur intérêt dans la formulation des vaccins ARNm. De nombreux vecteurs sont en cours d'étude dans l'optique d'améliorer l'efficacité et surtout l'innocuité in vivo. Enfin il n'y aura jamais de vecteur « idéal » disponible sur le marché. Chacun possède des propriétés plus ou moins avantageuses en fonction de l'objectif thérapeutique recherché.

## 7. Assurer la bonne traduction en protéine :

La formulation des systèmes de protection et d'administration n'est pas le seul paramètre pour la création de vaccins efficaces. L'optimisation de la structure d'ARNm est aussi un point à ne pas négliger<sup>(18)</sup>.

Une fois que le vecteur a atteint la cellule cible, il faut que le transcrit d'intérêt soit traduit correctement et en quantité suffisante. Afin d'améliorer et de rendre possible la traduction, il est important de s'intéresser à la structure des différentes régions de l'ARNm.

### 7.1. Eléments structurels des ARNm<sup>(18, 76)</sup>

Les ARNm qui composent les vaccins doivent contenir des éléments de structures indispensables à la bonne traduction en protéines. Ils sont munis d'une coiffe 5' (5' cap) qui permet de stabiliser l'ARNm. Vient ensuite une région 5'UTR non codante qui permet l'initiation de la traduction et charge les ribosomes sur l'ARNm. Cette région est suivie d'une succession de codons optimisés afin de permettre une élongation efficace. Un codon stop, placé de manière optimale, annonce la terminaison de la traduction. Pour terminer, une région 3'UTR et une queue de poly-A servent d'agents stabilisateurs.

En modifiant des éléments tels que la structure de la coiffe, les régions non traduites (UTR) et les queues polyadénylées (poly(A)), il est possible de contrôler et d'optimiser efficacement la durée d'expression et le profil cinétique de la future protéine (*Figure 16*).

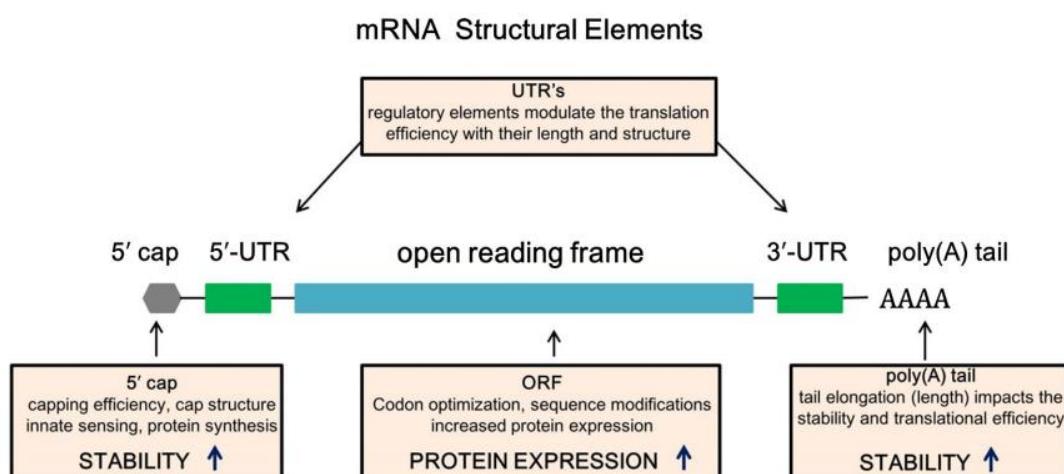


Figure 16: Eléments de structure des ARNm produit in vitro<sup>(77)</sup>

## 7.2. La coiffe 5' (78)

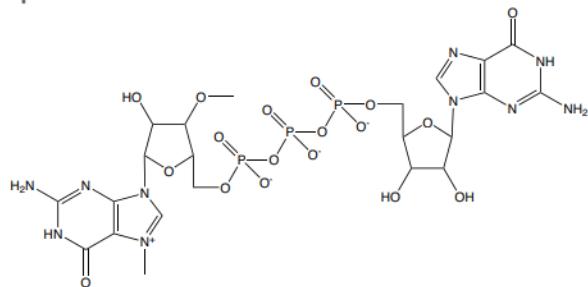
La coiffe 5' se connecte au premier nucléotide via un pont triphosphate lors de la transcription in vitro de l'ARNm. Son rôle est de servir d'agent stabilisateur de séquence. De plus, il permet au ribosome de reconnaître l'ARNm en se liant au facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (Elf4E). Il existe deux approches dans l'ajout d'une coiffe 5'. La première est le coiffage co-transcriptionnel où un analogue de cap est présent dans la réaction de transcription. Dans ce cas un groupement 7-méthylguanosine (m7G) est suivi d'une connexion triphosphate au premier nucléotide ce qui donne une coiffe m7GpppN. La deuxième approche est le coiffage post-transcriptionnel, où l'ARNm transcrit est coiffé à l'aide d'enzymes.

L'ajout d'un analogue de coiffe pose un défi technique, car parfois cet analogue peut se lier de manière inverse à la séquence d'ARNm. Dans ce cas, des isomères d'ARNm se forment et conduisent à une faible efficacité de la traduction. C'est pourquoi des analogues de coiffe anti-inverse (ARCA) ont été développés. Ces groupements ARCA ont été modifiés en C2 ou en C3 afin que les groupements méthyles réagissent avec les groupes hydroxyles au bon site pendant la transcription in vitro. Les ARNm coiffés par ARCA montrent une efficacité de traduction près de deux fois supérieur par rapport aux ARNm coiffés par des analogues conventionnels. De plus les ARNm coiffés par ARCA ont une demi-vie plus longue dans les cellules cultivées in vitro.<sup>77</sup> Enfin des améliorations des coiffes ARCA sont toujours à l'étude, dans le but d'améliorer l'affinité pour le facteur d'initiation de la traduction et d'améliorer la stabilité.

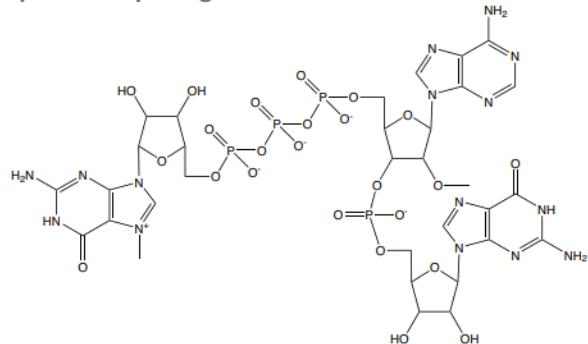
Par exemple des travaux sur l'ajout d'un composé phosphorothioate amélioreraient l'efficacité de la traduction en augmentant l'affinité pour le facteur eIF4E. D'autres analogues de coiffe composés d'une modification 1,2-dithiodiphosphate, ARCA et d'une chaîne polyphosphate appelée analogue « 2S » ont eux aussi montré une efficacité accrue. Un autre analogue du cap, appelé « CleanCap », a été développé en 2018. Il consiste en un tri nucléotide. Ici la première base de l'ARNm est méthylique en position 2', le cap est appelé Cap1<sup>(79, 80)</sup>.

Les ARNm produits in vitro les plus fonctionnels semblent ceux produits par coiffage Co-transcriptionnel à l'aide du Clean Cap méthylique. Il présente le double avantage d'être un cap « anti-inverse » et de ne pas concurrencer le GTP pour initier la transcription (*Figure 17*)<sup>(81)</sup>.

A | ARCA



B | CleanCap Reagents AG



C | CleanCap Reagents AG (3' OMe)

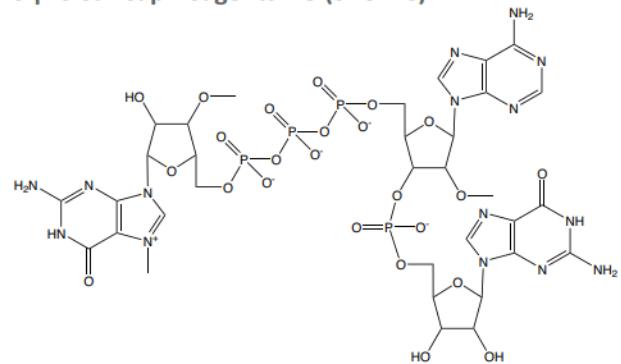


Figure 17: Structure de coiffe ARCA et de coiffe "Clean Cap"<sup>(79)</sup>

### 7.3. Régions 5'UTR et 3'UTR : stabilisateurs de séquence<sup>(77, 78, 82)</sup>

Les UTR sont des régions non codantes des ARNm. Elles sont très importantes, car elles comprennent des régions régulatrices liées à la stabilité de l'ARNm, à la reconnaissance des ribosomes, à l'interaction avec les composants de la machinerie de traduction et aux structures secondaires de l'ARNm. Les UTR peuvent également influencer le taux de dégradation de l'ARN et l'efficacité de la traduction.

La région non traduite 5' UTR est la section en amont de la région codante. C'est une région critique, car elle sert de site de liaison aux ribosomes. Certaines séquences particulières peuvent être ajoutées à 5'UTR afin d'améliorer la stabilité de l'ARNm et la précision de la traduction. Par exemple la « séquence kozac » : GCC-(A/G)-CCAUGG dans cette région, conduisant à un démarrage plus précis du processus de traduction. De plus au cours des nombreuses recherches, il a été montré que les régions 5'UTR courtes sont plus propices au processus de traduction.

La région 3'UTR permet de stabiliser la séquence d'ARNm et permet de faciliter la liaison avec la queue poly(A). La région 3' doit être formée avec des séquences très structurées pour améliorer ses performances ; par exemple les séquences enrichies en adénosine et uracile ou les séquences enrichies en guanine et uracile. De plus, les performances de l'UTR peuvent varier selon les différents types de cellules. Il convient donc d'envisager de décider de la population cellulaire et d'optimiser le 3'UTR pour les types de cellules cibles<sup>(83)</sup>.

Aujourd'hui, la plupart des thérapies à base d'ARNm tirent leurs UTR de gènes humains hautement exprimés tels que l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -globine. Des analyses à haut débit sont donc en cours, ceci afin de produire des banques de données suffisantes pour développer des modèles prédictifs et concevoir des séquences de novo qui optimisent l'expression des protéines<sup>(84)</sup>.

#### 7.4. Cadre de lecture ouvert (ORF)<sup>(77)</sup>

En tant que région codante de l'ARNm, le taux de traduction de la région ORF est crucial. Par conséquent, le choix des codons appropriés dans cette région peut optimiser efficacement la traduction de l'ARNm. La modification des nucléotides influence alors la structure secondaire de l'ARNm, l'efficacité de la traduction, l'abondance de l'ARNm et le repliement des protéines.

La séquence ORF peut être optimisée en remplaçant les codons rares par des codons plus fréquents pour le même acide aminé. En effet, il existe jusqu'à six codons pouvant coder pour un même acide aminé. L'utilisation de codons synonymes peut être considérée comme un code secondaire qui influence l'efficacité et la fidélité de la traduction. Les codons considérés comme « optimaux » correspondent aux espèces d'ARN de transfert les plus abondants. En effet, le rôle des ARN de transfert est d'apparier les codons des ARN avec leur acide aminé correspondant. Plus ces derniers sont exprimés plus la traduction sera rapide.

Les analyses du transcriptome montrent que les gènes fortement exprimés présentent tous des codons « optimaux ». Dans le contexte de la conception de vaccins, augmenter le niveau d'optimalité conduit à une production plus élevée de protéines par molécule d'ARNm et à la possibilité de réduire la dose requise. Cependant, un taux de traduction élevé de l'ARNm n'est pas toujours bénéfique, car certaines protéines nécessitent un faible taux de traduction pour se replier correctement, de manière stable et efficace ; dans ce cas, l'utilisation de codons à faible fréquence dans l'ORF peut donner des produits protéiques de meilleure qualité<sup>(78, 85, 86, 87)</sup>.

Une autre stratégie est l'utilisation optimisée de dicodons, ou, en d'autres termes, l'utilisation de paires de codons qui, ensemble, assurent une traduction optimale. Il a été démontré que la réduction du nombre de dinucléotides UU et UA dans l'ORF protège l'ARNm produit *in vitro* des enzymes de décapsulage. La troisième stratégie consiste à utiliser une séquence ORF avec les mêmes ratios de codons que ceux trouvés dans les gènes humains naturels hautement exprimés. Par conséquent, en fonction de l'antigène cible, différentes stratégies peuvent être adoptées pour trouver le bon équilibre entre rapidité de traduction et qualité de traduction<sup>(87)</sup>. En plus de l'optimisation des codons, l'incorporation de nucléotides modifiés est aussi une stratégie possible. Par exemple, il a été largement décrit que la teneur en guanine et en cytosine, joue un rôle central dans le contrôle de la stabilité. Bien qu'une teneur élevée en GC puisse poser des problèmes pour la structure secondaire de l'ARNm, la séquence GC supérieure se traduit 100 fois plus qu'une séquence GC faible. Par ailleurs, les structures riches en uridines sont reconnues par les récepteurs de reconnaissance de formes (PPR), activant une réponse immunitaire innée indésirable (mimant celle déclenchée par un agent pathogène). Le but du vaccin n'étant pas de produire une réaction immunitaire trop forte et potentiellement nocive pour le patient il est donc préférable d'éviter les structures trop riches en uridines<sup>(88)</sup>.

D'autres modifications sont décrites, par exemple ; remplacer la cytidine par la 5-méthylcytidine (m5C), l'uridine par la 5-méthyluridine (m5U), ainsi que l'adénosine par la N1-méthyladénosine (m1A) et la N6-méthyladénosine (m6A), la 2-thiouridine (s2U), la 5-méthoxyuridine (5moU), la pseudouridine ( $\psi$ ) et la N1-méthylpseudouridine (m1 $\psi$ ). Parmi eux, m5C et  $\psi$  sont préférables dans les modifications de paires de bases parce qu'ils réduisent simultanément l'immunogénicité et améliorent l'efficacité de la traduction. De plus, il a été constaté que la substitution nucléotidique par N1-méthyl-pseudouridine (1m $\psi$ ) augmente la

stabilité des paires de bases, ce qui entraîne une structure secondaire complexe et une traduction améliorée de l'ARNm<sup>(85)</sup>.

Actuellement les deux vaccins autorisés par la FDA contiennent des nucléosides modifiés. Dans le cas des vaccins COVID-19 de Moderna et BioNTech/Pfizer, il a été montré que l'incorporation d'uridines modifiées, telle que l'utilisation de 1-méthyl-pseudouridine à la place de l'uridine, induit des changements globaux dans la structure secondaire de l'ARNm qui sont corrélés à une expression élevée de la protéine. Il est important de noter que l'introduction de ces uridines modifiées à l'intérieur de la construction de l'ARNm est actuellement le moyen le plus efficace de minimiser la reconnaissance cellulaire de l'ARNm par les protéines de liaison. Cela renforce la stabilité biologique et la capacité de traduction, tout en réduisant le risque de réaction immunitaire non désirable des vaccins ARNm<sup>(18)</sup>. Un autre vaccin en cours d'études contre le cytomégalovirus a montré que l'utilisation de nucléotides modifiés dans la formation de la glycoprotéine B a provoqué une réponse en anticorps plus durable et plus étendue par rapport à une séquence non modifiée<sup>(89)</sup>.

## 7.5. Modification de la queue poly(A)

La plupart des ARNm des cellules eucaryotes possèdent des « queues poly(A) » composée d'une dizaine à une centaine de base à l'extrémité 3'. Les différentes longueurs de queues poly(A) 3' aident à réguler la stabilité, le transport et la traduction de l'ARNm mature. La queue poly(A) fait une longueur typique de 60 à 150 nucléotides, essentielle à la reconnaissance de l'ARNm par la protéine de liaison poly-A (PABP) qui interagit ensuite avec le complexe eiF4G.

Dans la formulation des vaccins, le poly(A), composé d'une succession d'adénosine, est essentielle à la fois pour la traduction et la stabilité de l'ARNm. La première est une approche de polyadénylation enzymatique utilisant une poly-A polymérase (PAP) recombinante. L'enzyme ajoute une queue poly-A à l'extrémité 3' de l'ARNm après la synthèse des ARNm. Ce procédé conduit alors à des produits de longueurs différentes, ce qui rend difficile la réponse aux exigences réglementaires, car le contrôle des lots devient plus complexe. Une autre méthode est la co-transcription de la queue poly-A lors de la synthèse de l'ARNm générant des produits homologues. Dans les deux cas, les queues poly-A peuvent être segmentées par des agents espaceurs. Les poly-A segmentées ont montré des performances élevées en termes de demi-vie et d'efficacité de traduction par rapport aux poly-A homologues simples<sup>(90, 91)</sup>.

## 7.6. Utilisation d'ARNm auto-amplifiés (SAM)

Les SAM (« self-amplifying messenger ») sont des ARNm capables de s'auto amplifier in vivo. Ils ne codent pas seulement l'antigène cible, mais aussi des facteurs "auto-ampliants" codants pour une ARN polymérase. Ils sont généralement constitués de deux fois plus de nucléotides que les ARNm non réplicatifs. Ces vaccins sont en cours d'études dans le but de développer un vaccin efficace avec des doses inférieures par rapport aux vaccins ARN « classiques ». Ainsi, la répliqueuse peut amplifier le SAM et transcrire l'ARN sous-génomique. L'antigène est ensuite traduit à partir de l'ARN sous-génomique. Ainsi, des réponses immunitaires similaires peuvent être obtenues en utilisant moins d'ARN<sup>(92)</sup>.

Le SAM contient les séquences codantes d'un complexe de répliqueuse virale, un promoteur génomique et un promoteur subgénomique (SG). La plupart des SAM sont basés sur le génome d'alphavirus tels que le virus Sindbis (SINV), le virus Semliki Forest (SFV) et le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV). Les alphavirus sont un groupe de petits virus à ARN enveloppés à brin positif produisant des quantités considérables d'ARN subgénomique codant pour des protéines structurales virales. Les SAM bénéficient de la capacité d'auto-réPLICATION de ces alphavirus en conservant leurs protéines non structurales (nsP1-4), car les protéines structurales virales sont remplacées par les gènes d'intérêts. Cela rend l'ARNm incapable de produire des particules virales infectieuses. Par rapport aux vaccins à ARNm conventionnels, l'ajout du gène de la répliqueuse de l'alphavirus de 7 à 8 kb augmente considérablement la longueur de l'ARN (au total 9 à 12 kb).

Après avoir été délivré dans le cytosol d'une cellule, l'ARNm libéré est compétent en traduction et s'engage avec le ribosome de la cellule hôte pour produire les quatre composants fonctionnels de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RDRP) ou appareil de réPLICATION du génome viral : nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4. Le complexe répliqueuse et un ensemble multifonctionnel où chaque protéine possède sa propre fonction. nsP1 est une enzyme nécessaire au coiffage en 5' de l'ARN viral et sert d'ancre pour attacher le complexe répliqueuse à la membrane plasmique. nsP2 a une activité hélicase pour dérouler le duplex d'ARN pendant la réPLICATION, mais a également une activité protéase importante clivant la polyprotéine en nsP individuelles. La fonction de nsP3 n'est pas encore complètement comprise, mais il s'agit certainement d'un composé essentiel du complexe répliqueuse. nsP4 est une ARN polymérase ARN-dépendante et structure le complexe répliqueuse. (*Figure 18*)

Des études chez les primates et le porc ont montré une rémanence de l'ARNm auto-amplifier largement supérieure à l'ARNm non amplifié. Par exemple chez le porc l'expression de l'ARNm auto-amplifié a persisté deux fois plus longtemps qu'avec l'ARNm non amplifié. De plus, dans un contexte de vaccination il a été montré que les SAM peuvent être délivrés à des concentrations plus faibles que les ARNm conventionnels non modifiés tout en obtenant une protection équivalente contre les virus de la grippe<sup>(94)</sup>.

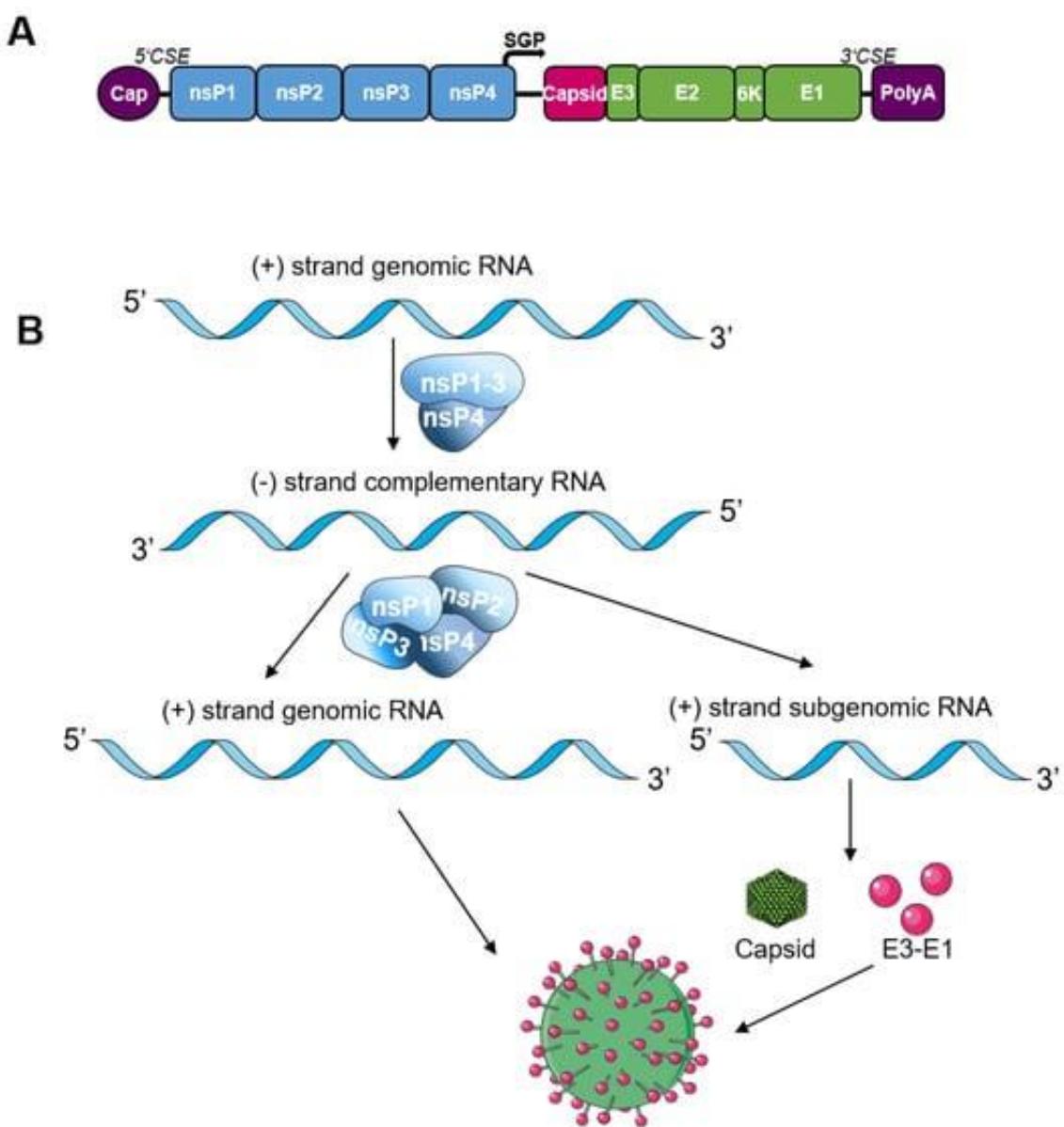


Figure 18: Structure et mode d'action des ARNm auto-amplifiés<sup>(95)</sup>

Il est important de noter que l'utilisation des ARNm auto-amplifié reste plus compliquée que les ARNm conventionnels, cela en grande partie à cause de leur taille. De plus, les SAM codent non seulement pour les protéines d'intérêts, mais aussi pour les nSp virales qui pourraient être immunogènes et limiteraient l'utilisation répétée d'ARNm auto-amplifié.

Des améliorations comme l'utilisation d'ARN trans-amplificateurs sont donc à l'étude. Dans ce cas, le SAM est divisé en deux transcrits, l'un contient les gènes d'intérêts tandis que le deuxième code pour les nSp virales. L'étude d'utilisation d'hémagglutinines de la grippe à l'aide d'utilisation d'ARNm trans-amplificateur, a montré avec succès une réponse immunitaire protectrice chez la souris lors d'une injection intradermique. (*Figure 19*)

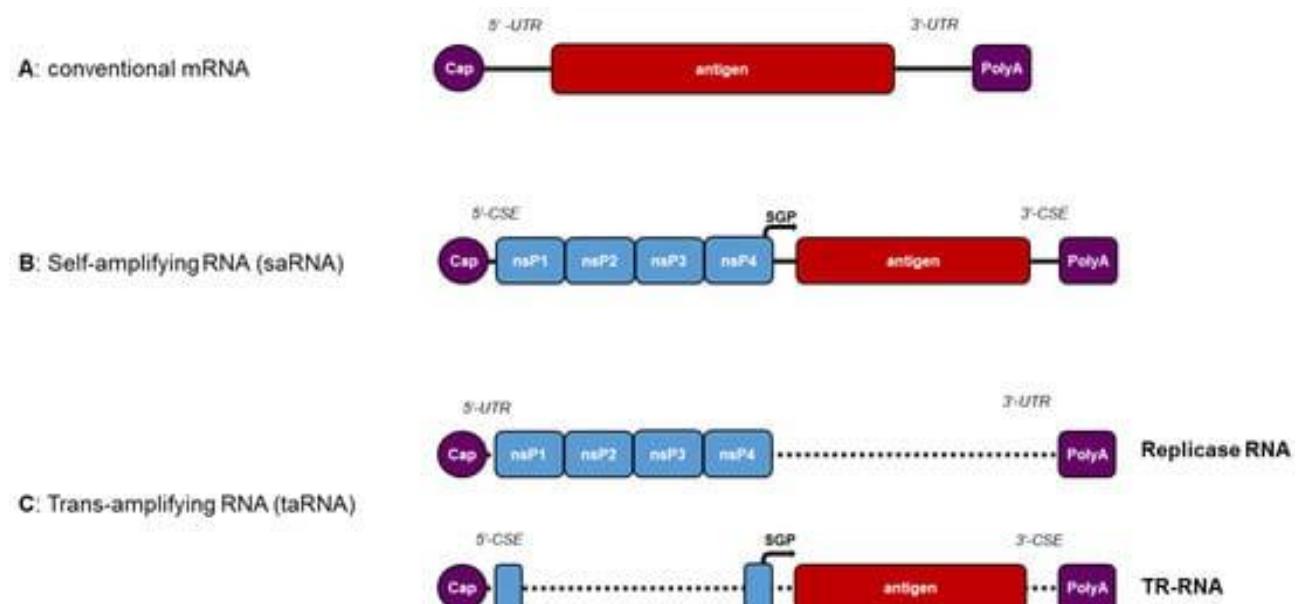


Figure 19: Comparaison des différentes structures d'ARNm<sup>(95)</sup>.

Tout comme les ARNm conventionnels, les SAM nus sont rapidement détruits et doivent bénéficier d'un vecteur approprié pour une efficacité optimale. À cause de leur taille et de leurs modifications de séquence, ils nécessitent de nouvelles formulations pour être administrés. Dans une comparaison des formulations d'ARN auto-amplifiés avec des liposomes, des nanoparticules lipidiques, des nanoparticules polymères et des émulsions, l'induction la plus puissante de réponses immunitaires s'est produite avec des nanoparticules polymères. Des LNP SAM optimisés ont également été développés<sup>(95)</sup>. Des études précliniques comparatives démontrant les avantages du saRNA (« self-amplifying) par rapport à l'ARNm classique sont menées sur des modèles murins. À l'instar des vaccins à ARN, les SAM pourraient ne pas se

limiter aux maladies infectieuses, et être utilisés en thérapie génique, pour lutter contre le cancer ou des pathologies rares.

## 8. Choix du mode d'administration<sup>(96, 97)</sup>

Des propriétés telles que la composition, la charge et la taille des vecteurs affectent directement les caractéristiques pharmacocinétiques et la puissance des ARNm. La voie d'administration influence aussi l'efficacité de la vaccination.

Un intérêt est aussi porté à la « livraison ciblée », où l'administration vise en une injection directe dans le tissu ou l'organe ciblé (*Figure 20, Tableau I*).

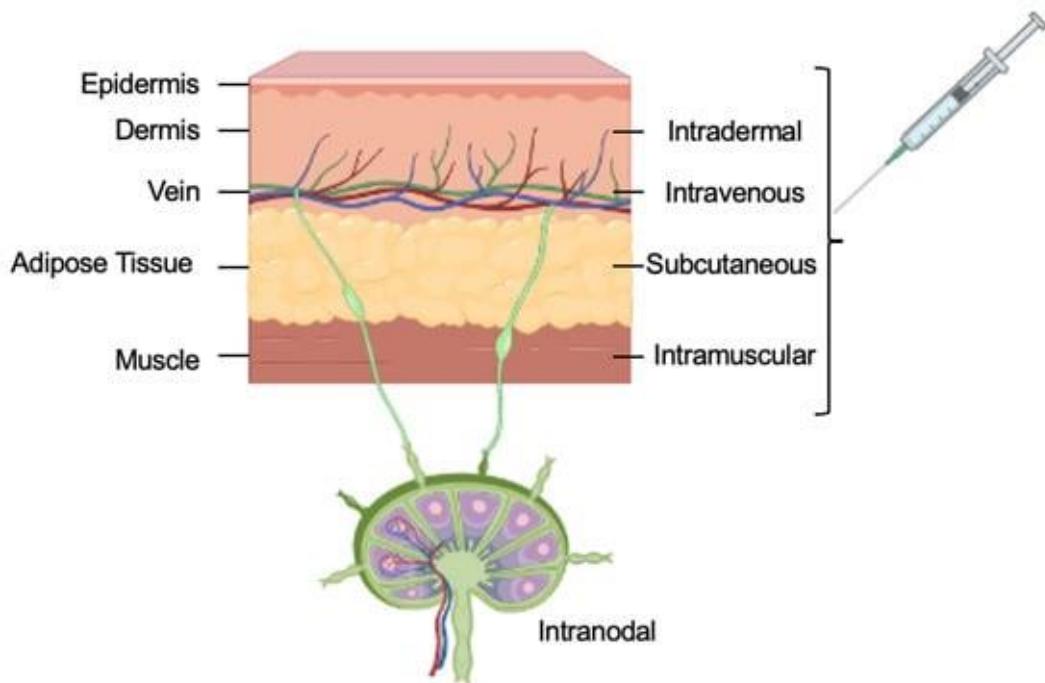


Figure 20: Voies d'administrations des vaccins ARNm<sup>(96)</sup>

Tableau I : Synthèse non exhaustive des spécifiques des voies d'administrations des vaccins à ARNm

<b>Voie</b>	<b>Description</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Intra-musculaire (IM)<sup>(96, 97)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Possède un vaste réseau de vaisseaux sanguins qui recrutent et font circuler diverses cellules immunitaires</li> <li>Voie utilisée pour le vaccin contre le virus SARS-CoV-2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Les nanoparticules inférieures à 150 nm sont facilement transportées vers les organes lymphatiques</li> <li>Les nanoparticules plus importantes sont facilement phagocytées par les cellules immunitaires pour être à leur tour transportées vers les ganglions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Douleur au point d'injection</li> </ul>
<b>Sous-cutanée (SC) et intra-dermique<sup>(96)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Milieu riche en cellules immunitaires</li> <li>Cellules dendritiques</li> <li>Cellules de Langerhans</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Volume d'injection important</li> <li>Pression abaissé et douleur au point d'injection réduite</li> <li>Réponse immunitaire rapide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Besoin de personnel formé</li> </ul>
<b>Intra-veineuse (IV)<sup>(16, 96)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Délivré en systémique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rapide passage de l'ARN vers les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes</li> <li>Quantité d'antigènes produits élevée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Risque de liaison aux protéines plasmatiques</li> <li>Exposition prolongée aux nucléases</li> <li>Forces mécaniques importantes</li> <li>Risque important d'effet secondaire grave</li> <li>Risque de production massive de cytokines (peut conduire jusqu'au choc anaphylactique)</li> </ul>
<b>Intra-nodales<sup>(96)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ganglions lymphatiques abritent une grande quantité de cellule présentatrices d'antigène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intérêt pour les thérapies dans le cancer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efficacité démontrée pour les vaccins ADN, en revanche son efficacité</li> </ul>

			<p>pour les vaccins ARNm reste encore à explorer</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Réalisées par un personnel de santé qualifié, avec un matériel spécifique car l'administration nécessite un guidage par échographie</li> <li>Difficulté à mettre en place à grande échelle</li> </ul>
<b>Orale<sup>(98)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Voie délaissée dans l'administration de vaccin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intérêt dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH acide de l'estomac,</li> <li>Enzymes digestives,</li> <li>Barrière intestinale</li> </ul>
<b>Aérienne<sup>(99, 100)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Présence de cellules dendritiques pulmonaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intérêt dans les pathologies des voies aériennes</li> <li>Etude de phase I en cours (vaccin contre SARS-CoV-2 par nébulisation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Barrières physiques et biologiques (volume du poumon important, mouvement respiratoire...)</li> </ul>

En conclusion, le choix de la bonne voie d'administration est aussi important que le choix du vecteur approprié, car la voie d'administration influence à la fois la quantité totale de protéines produites ainsi que la durée d'expression. Lors du développement d'un vaccin, des études sur ces deux paramètres sont indispensables à mettre en place pour choisir la voie la plus appropriée<sup>(96)</sup>.

## 9. Quels contrôles qualité ?

Pour permettre la mise en place d'études cliniques et, à terme, une mise sur le marché, des techniques d'étude de la stabilité de l'ARNm sont développées pour le contrôle de la qualité. Ces tests sont d'abord réalisés sur les ARNm nus.

### 9.1. Déterminer la pureté et la stabilité de l'ARNm avant l'inoculation

Lors du développement de vaccins à grande échelle, il est essentiel de disposer d'une méthode standardisée capable de surveiller la pureté et l'intégrité de l'ARNm.

L'électrophorèse est une technique fréquemment utilisée car elle fournit des informations sur la taille et sur la stabilité de l'ARNm. Lorsque l'ARNm se dégrade et que des ruptures de brins s'opèrent, l'intensité de la bande à la longueur attendue de l'ARNm diminue, tandis que de nouvelles bandes correspondantes aux produits de dégradation apparaissent. Des méthodes micro fluidiques à haut débits sont aussi à l'étude, afin de détecter efficacement les contaminants présents dans les échantillons d'ARNm. L'important est de quantifier et d'identifier les fragments d'ARN double brins indésirables. Pour se faire, les échantillons sont préparés puis une matrice gel est préparée. Les ARNm qui se sont fragmentés vont se diriger préférentiellement vers un type de fluophore (SYTO 61®) contrairement aux ARNm intégrés qui répondent mieux à un autre type de fluophore (RiboRed®). Cette méthode peut également être utilisée pour détecter des molécules d'acide nucléique partiellement double brin et repliées.<sup>101</sup> D'autres groupes ont analysé des échantillons d'ARNm dans des puces micro fluidiques. L'électrophorèse capillaire sur micropuce permet de déterminer la pureté et l'intégrité de l'ARNm avant et après encapsulation dans les nanoparticules lipidiques. Cette méthode permet une analyse d'échantillons à haut débit en raison du temps d'exécution court d'environ 70 s par échantillon et peut analyser une plaque de 96 puits en environ 2,5 h<sup>(102)</sup>. Enfin des techniques de chromatographie haute définition peuvent être employées à des fins de purification ou pour mesurer le taux d'ARNm libre et l'ARNm encapsulé dans les lipoprotéines<sup>(18)</sup>.

## 9.2. Sécurité : Vaccins ARNm vs vaccins « conventionnels »

Des effets indésirables sont à prévoir avec les vaccins à ARNm. Pour les vaccins contre la Covid19 des effets tels qu'un gonflement, une douleur, une rougeur au point d'injection, des maux de tête et de la fièvre ont été décrits. Ces effets secondaires sont également retrouvés avec les vaccins « conventionnels »<sup>(104)</sup>. Une étude de pharmacovigilance a comparé le vaccin à ARNm contre la COVID-19 et le vaccin contre la grippe. Cette étude s'étend sur un an (janvier 2020 à janvier 2021)<sup>(104)</sup>. Ces données provisoires de surveillance de l'innocuité ont révélé que les profils d'innocuité des nouveaux vaccins à ARNm peuvent différer de ceux des vaccins contre la grippe ; le schéma général suggère que les réactions systématiques telles que le frisson, la myalgie et la fatigue étaient plus visibles avec le vaccin à ARNm contre la COVID-19, tandis que les événements de réactions cutanées au site d'injection étaient plus fréquents avec le vaccin contre la grippe.

Il est à noter que les vaccins à ARNm ont démontré un risque significativement plus élevé de complications cardiovasculaires, telles que la crise hypertensive et la tachycardie supraventriculaire (SVT), par rapport aux vaccins contre la grippe. Le risque de complications neurologiques (dyskinésie, trouble de la marche) semblait, quant à lui, moins important. Cette étude n'a pas pu démontrer de risques significatifs concernant la vaccination par ARNm dans des contextes réels. De plus cette étude compare deux vaccins et ne nous permet pas de conclure à une généralité sur les vaccins ARNm. Il faut désormais comprendre si les effets indésirables sont liés à l'ARNm en lui-même ou encore à la structure du vecteur.

Les effets indésirables potentiels des vaccins ARNm sont encore mal connus. Des hypothèses quant à la survenue d'événements indésirables spécifiquement liés à la technologie ARNm sont en cours d'étude. Ensuite, la composition et la taille des vecteurs sont aussi à prendre en compte afin de limiter les éventuels effets indésirables. Actuellement, il n'y a pas de généralité quant aux effets indésirables. Chaque vaccin code pour un antigène spécifique et est à risque de provoquer des réactions non désirables. Comme pour chaque médicament, les études cliniques et post commercialisation permettront de mieux appréhender ce risque d'effets indésirables à l'avenir.

## Chapitre 2 : Apports et limites des ARNm dans la prise en charge de nombreuses pathologies.

### 1. Exemple de la COVID19 : Premier vaccin ARNm disponible sur le marché et espoir pour d'autres pathologies.

En 2020, la pandémie de COVID-19 a promu le développement de vaccins ARNm. Dans l'ensemble, l'efficacité des vaccins ARNm contre le SRAS-CoV-2 ; le BNT162b2 développé par Pfizer et l'ARNm-1273 développé par Moderna ont été efficaces pour prévenir l'infection par les nombreux variants de la Covid, réduisant ainsi les hospitalisations et la mortalité<sup>(105)</sup>. Ces résultats encourageants ont propulsé les recherches pour le traitement d'autres pathologies. En effet, des études sont déjà en cours afin de tester l'efficacité des ARNm dans le traitement de maladies infectieuses, ou encore en oncologie.

Dans la suite de ce mémoire, nous aborderons les différents domaines dans lesquels les thérapies ARNm sont en cours d'études ou en essai clinique pour le développement de nouveaux médicaments candidats (*Figure 21*).

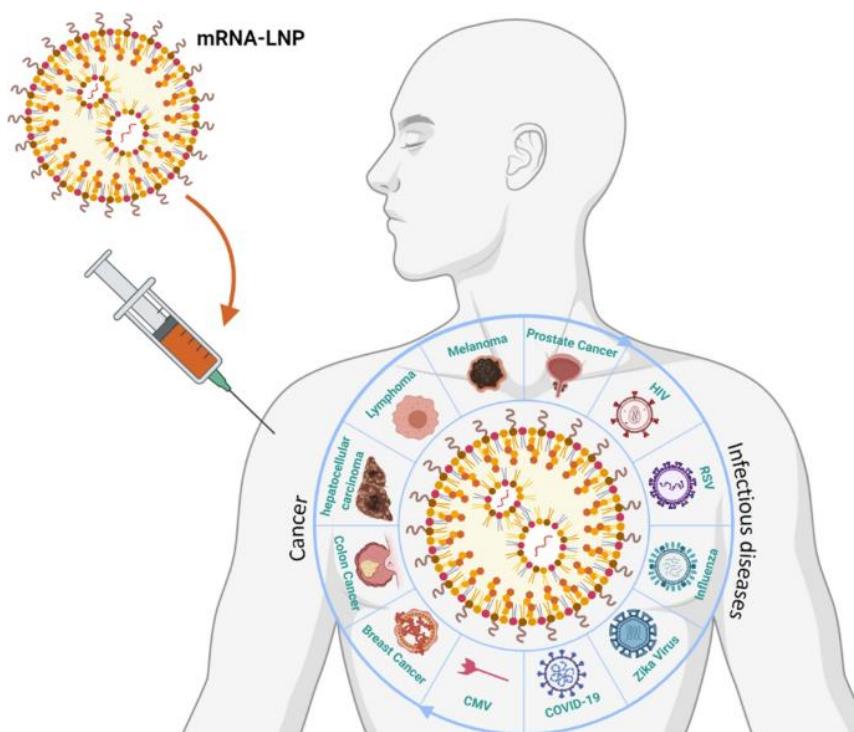


Figure 21: Synthèse non exhaustive des domaines des recherches sur les ARNm<sup>(106)</sup>

## 2. Lutte contre les pathologies infectieuses

L'épidémie de Covid ainsi que les dernières épidémies d'Ebola et de Zika ont démontré à quelle vitesse les maladies infectieuses émergentes ou ré émergentes peuvent se propager. Ces données, soulignent la nécessité cruciale de disposer d'une plateforme technologique de vaccination rapide. Les vaccins à ARNm semblent alors être de bons candidats pour un développement ciblé, rapide et à grande échelle contre ces maladies<sup>(107)</sup>. Les vaccins ARNm sont donc un espoir dans la prise en charge des maladies virales, mais sont aussi à l'étude contre les parasites et les bactéries.

### 2.1. Vaccins à ARNm ciblant le virus de la grippe<sup>(107, 108, 109)</sup>

La grippe est un pathogène ayant un impact mondial qui provoque une morbidité et une mortalité importante chez l'Homme par le biais d'épidémies annuelles et de pandémies sporadiques. On estime que chaque année, l'infection grippale saisonnière entraîne entre 291 000 et 650 000 décès dans le monde. Dans ce cadre, les vaccins à ARNm contre le virus de la grippe sont parmi les plus étudiés, en partie parce qu'ils représentent une part de marché importante. Bien qu'il existe déjà des vaccins anti-grippaux sur le marché, leur efficacité est soumise à la grande diversité et variabilité du virus de la grippe chaque année.

Le virus de la grippe appartient à un groupe de virus hétérogène à ARN simple brin négatif. A ce jour, quatre espèces de virus grippaux A, B, C et D sont reconnues par le comité international de taxonomie des virus. Les virus de type A infectent l'être humain et de nombreuses espèces animales. Les espèces aviaires (oiseaux aquatiques sauvages, volailles), et mammifères (le porc, par ex.) constituent alors un réservoir. Les virus de la catégorie A sont responsable des pandémies de grippe (par exemple la pandémie de grippe A H1N1 en 2009). Ils sont classés en sous-types notés HxNy, sur la base de leurs protéines de surface, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (Na). C'est un groupe qui présente beaucoup de variabilité, liée à la fois à un déplacement antigénique et à une dérive antigénique. Les virus de type B infectent quasi-exclusivement l'être humain. Enfin, les virus de type C et D provoquent une maladie généralement bénigne.

Pour stimuler notre système immunitaire, les recherches portent principalement sur les antigènes HA (hémagglutinines), et les NA (neuraminidases). Ces deux protéines sont situées

à la surface du virus ; l'HA est responsable de la fixation de la particule virale à un récepteur situé sur la cellule cible, tandis que la NA permet aux virions de se détacher de la cellule hôte (*figure 22*).

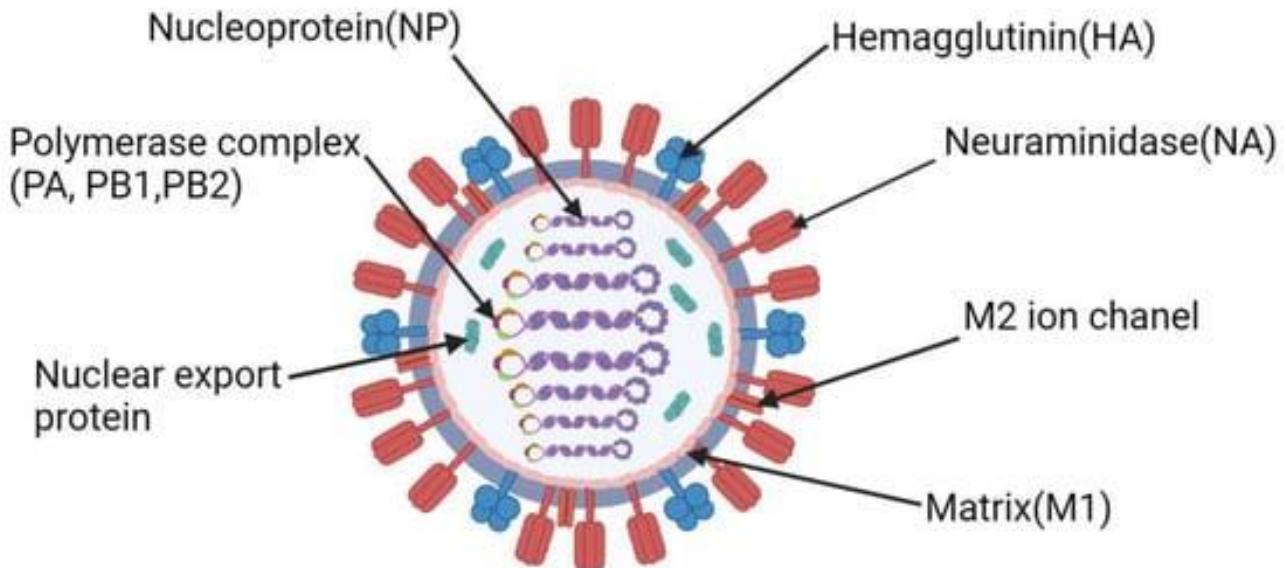


Figure 22: structure des virus de la grippe<sup>(108)</sup>

Aujourd’hui, les vaccins disponibles sur le marché induisent des réponses immunitaires grâce à la protéine HA. C'est une protéine hautement immunogène, mais qui subit une dérive génétique, ce qui nécessite une réévaluation constante de la formulation des vaccins. C'est pourquoi la fabrication et la distribution des vaccins nécessitent une sélection des souches vaccinales de plus de six mois en avance. Ce temps de préparation crée ainsi une fenêtre pendant laquelle un nouveau variant peut émerger ou devenir dominant de manière inattendue. C'est pourquoi les vaccins ARNm ont un rôle à jouer parmi le panel de vaccins contre la grippe.

### 2.1.1. Points forts de ARNm

Premièrement, les vaccins à ARNm peuvent être produits plus rapidement que les vaccins actuels, ce qui pourrait réduire le temps écoulé entre la sélection de la souche et l'administration pour répondre plus rapidement aux futures pandémies. La production évolutive de vaccins à ARNm facilite également la mise à jour des souches vaccinales et apporte, ici, une réponse à la dérive antigénique<sup>(110)</sup>.

Deuxièmement, avec les ARNm il y a la possibilité de créer des vaccins « multivalent ». Les tests de multivalence ont été étendus davantage pour produire des formulations quadrivalentes, qui ont ensuite été administrées à des primates non humains à des fins d'immunisation. Plusieurs transcrits d'ARNm peuvent être alors conditionnés et délivrés sous la forme d'une combinaison de deux ou quatre antigènes sans différence dans l'ampleur des réponses immunitaires humorales par rapport à l'antigène délivré sous forme monovalente<sup>(111)</sup>. En outre, la flexibilité qu'apportent les vaccins ARNm permettra de formuler des vaccins combinant les cibles de la Grippe et de la Covid.

Enfin, la plateforme ARNm-LNP offre une grande flexibilité pour l'encapsulation de plusieurs antigènes. Dans le cas de la grippe des LNP d'ARNm bivalents et quadrivalent co-encapsulés ont été comparés aux ARNm monovalents. En termes d'efficacité, les résultats de cette étude n'ont pas montré de différence significative entre les ARNm co-encapsulés et les ARNm encapsulés individuellement. Les deux méthodes ont généré des titres d'anticorps équivalent<sup>(111)</sup>.

### **2.1.2. Etudes menées**

Actuellement, il existe une douzaine de vaccins contre la grippe à ARN messager et à ARN auto-amplificateur en cours d'essais cliniques ou précliniques. Un vaccin à ARNm codant pour les antigènes de l'hémagglutinine de 20 sous-types connus du virus grippal A et lignées du virus B, a montré une protection sur les souris et les furets. Chez la souris, le vaccin à ARNm auto-amplifié (HA) a induit de puissants anticorps neutralisants fonctionnels et des réponses immunitaires cellulaires, caractérisées par des lymphocytes T CD4 T helper 1 et CD8 cytotoxiques spécifiques à HA. Chez les furets la vaccination a induit une séroconversion consolidée après une deuxième dose de vaccin à 1 mois<sup>(112)</sup>.

Dans la continuité des travaux établis lors de la l'épidémie de coronavirus, Pfizer et BioNTech ont collaboré en 2022 afin de mener des essais cliniques de phase III<sup>113)</sup>. Pfizer dispose de deux vaccins monovalents codant pour l'hémagglutinine du H1N1 et de l'antigène AIV (« avian influenza virus ») de la lignée B/Yamagata, combinés en un seul vaccin bivalent.

Le candidat de Moderna, l'ARNm-1010, est un vaccin quadrivalent, codant pour l'hémagglutinine de la grippe A et B, sélectionnées sur la base des recommandations de l'OMS: lignées A/H1N1, A/H3N2, B/Yamagata et B/Victoria. Autrement dit, la possibilité d'utiliser des vaccins à ARNm fait déjà l'objet d'études actives et plusieurs prototypes sont testés chez l'homme. Il convient de noter que la commercialisation des vaccins à ARNm contre le virus de la grippe pourrait être plus difficile à diffuser auprès du public que celle contre la COVID-19, car il existe des options sans ARNm disponibles<sup>(108)</sup>.

Les vaccins à ARNm ont largement leur place dans les cas de pandémies. Néanmoins, des essais cliniques supplémentaires sont nécessaires pour affirmer l'innocuité et l'efficacité des vaccins contre la grippe à ARNm chez l'homme.

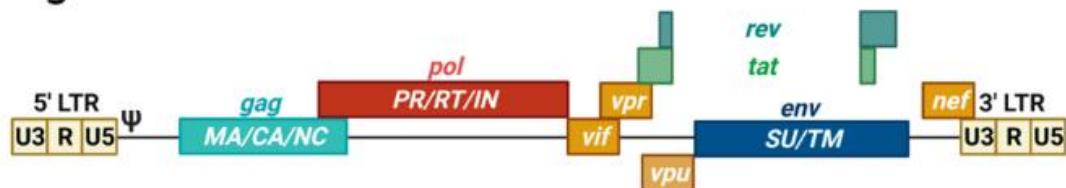
## 2.2. L'ARNm, un espoir pour les patients atteints de VIH<sup>(114)</sup> ?

Selon l'OMS, près de 40 millions de personnes vivaient avec le VIH en 2022. La thérapie antirétrovirale (TAR) s'avère très efficace pour prévenir de la transmission du VIH-1 et ralentir la progression clinique. Malgré ce succès, le coût des traitements reste toujours élevé et rend leur accessibilité difficile, notamment dans les pays en développement. De plus, la bonne observance est indispensable au bon fonctionnement de ces traitements qui ne sont pas dénués d'effets indésirables. Enfin, l'efficacité des TAR reste menacée par les résistances et les mutations des virus. Des efforts importants ont été déployés au cours des trente dernières années pour trouver un vaccin efficace. Le but serait d'induire la rémission du virus, la suppression de la virémie et le maintien du contrôle viral en l'absence de traitement antirétroviral.

Comme pour le virus de la grippe, il est indispensable de connaître la structure du virus afin de produire un ARNm compétent. Tout d'abord, le VIH est un virus à ARNm monocaténaire positif enveloppé. Il appartient à la famille des rétrovirus c'est-à-dire que leur génome présent sous forme d'ARN doit être transcrit en ADN par une transcriptase inverse. L'ADN synthétisé s'insère dans l'ADN cellulaire via ses extrémités LTR (long terminal repeat, séquences terminales redondantes) grâce à l'intégrase. Les virus détournent alors la machinerie cellulaire de l'hôte pour produire leurs propres protéines virales<sup>(114)</sup>.

Les antigènes connus sont présentés sur le schéma *Figure 23* et les protéines produites dans le *Tableau II*. Ils sont divisés en trois groupes ; Le premier est appelé « **Gag** » (group antigen) ; Il s'agit d'un gène qui code pour la matrice de protéines structurelles (MA), la capsid (CA) et la nucléocapside (NC) formant le noyau viral. Ensuite vient le gène « **Pol** » (polymérase) qui code pour les gènes de régulation ayant un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène tel que les enzymes virales protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Le gène Pol est suivi des deux gènes régulateurs rev et tat et de trois gènes accessoires vif, vpr et vpu. Puis, dans le troisième groupe on trouve le gène « **Env** » (enveloppe) qui code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale : l'unité de surface (SU) gp120 et l'unité transmembranaire (TU) gp41. Env est suivi d'un autre gène accessoire nef.

## HIV-1 genome



## HIV-1 mature virion

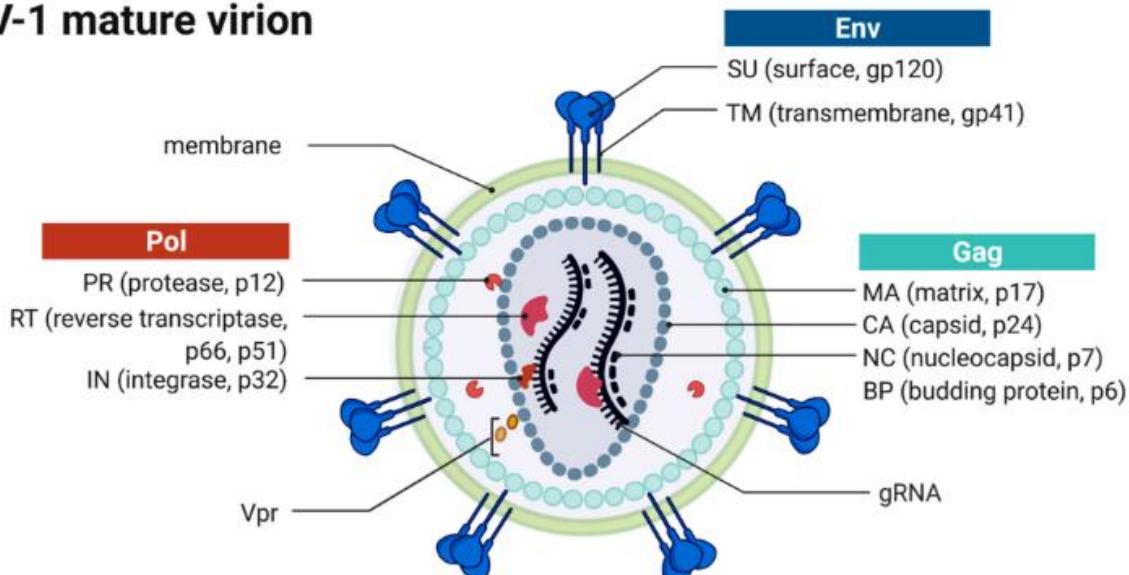


Figure 23: structure du virus du VIH-1<sup>(114)</sup>

Tableau II: Protéines codées par le gène du VIH-1 et leurs fonctions<sup>(115)</sup>

<b>Gag</b>	Code les protéines centrales p24, p7 et p6 et la protéine matricielle p17
<b>Pol</b>	Code pour la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase.
<b>Env</b>	Code pour gp120 et gp41, les glycoprotéines de l'enveloppe virale qui ciblent les récepteurs de la surface cellulaire
<b>Tat</b>	Augmente l'expression des gènes du VIH
<b>Vif</b>	Favorise le pouvoir infectieux des particules virales
<b>Vpu</b>	Participe à l'arrêt du cycle cellulaire
<b>Rev</b>	Régule l'exportation nucléaire de l'ARNm
<b>Nef</b>	Module la signalisation cellulaire

Le VIH pose un défi technique, car malgré la connaissance d'antigènes cibles, il n'y a toujours pas de vaccins disponibles sur le marché. Le cycle du virus explique en partie ces difficultés. En effet, le virus établit rapidement une infection chronique en s'intégrant dans le génome de l'hôte en tant que provirus, lui permettant d'échapper à la détection immunitaire. De plus, lorsque le virus a pénétré dans la cellule, il mute facilement, car la transcriptase inverse a tendance à commettre des erreurs de transcription. Ces mutations rendent le VIH plus difficile à contrôler, car les nombreuses mutations augmentent la probabilité de produire un VIH résistant aux attaques du système immunitaire et aux médicaments antirétroviraux. Ce pouvoir mutagène explique aussi la grande diversité de structure de la glycoprotéine d'enveloppe (Env.) qui limite la capacité à produire des anticorps efficaces.

Un autre défi réside dans le fait que le récepteur cellulaire du VIH est le CD4. Ce qui veut dire que les lymphocytes T CD4 auxiliaires sont la cible directe du virus. Ces derniers utilisent préférentiellement les corécepteurs CCR5 et CXCR4 qui se trouvent en grand nombre à la surface des lymphocytes T CD4+ présents dans les muqueuses du corps humain. Alors, les cellules T auxiliaires s'enflamment non seulement dans l'infection contre le VIH, mais ils sont aussi le site de réplication du virus. Ainsi, la vaccination peut susciter des réponses qui exacerbent les infections en stimulant la production de lymphocytes. Ce phénomène est appelé ADE (antibody-dependant enhancement) c'est-à-dire la facilitation de l'infection par des anticorps<sup>(116, 117)</sup>.

Dans le domaine des vaccins ARNm beaucoup d'études précliniques et cliniques sont à l'étude. En 2012 un premier vaccin LNP à ARNm auto-amplifié codant pour la protéine d'enveloppe gp140 a été testé chez la souris. Des réponses immunitaires spécifiques à l'Env ont été détectées selon plusieurs voies d'administration (IM, ID et sous-cutanée), les injections IM permettant d'obtenir des réponses supérieures des lymphocytes T CD8+<sup>(118)</sup>. Un autre vaccin à ARNm-LNP auto-amplifiant multivalent a été évalué chez les macaques rhésus et a montré une expansion des lymphocytes T. Une seule immunisation avec une faible dose de vaccin ARNm-LNP produisait de fortes réponses des cellules T CD4+, et des réponses IgG anti-gp120. Plus tard, une étude randomisée en double aveugle et contrôlée par placebo a été menée. Les ARNm codaient pour CD40L et Gag, Vpr, Rev et Nef. Au total, 35 participants ont terminé le traitement et 4 semaines après la dernière vaccination ont interrompu le TAR (ATI) pendant 12 semaines. Il existe une forte expansion des lymphocytes T chez les patients ayant reçu le vaccin, mais ce dernier n'a eu aucun impact sur le contrôle de la virémie puisque la charge virale a rebondi chez l'ensemble des participants<sup>(119)</sup>.

Par ailleurs un vaccin ARNm injecté par voie intra nodale a été testé chez l'homme et a atteint les essais cliniques de phase 1. Les patients séropositifs ont reçu trois doses intra nodales d'ARNm codant pour des séquences immunogènes du VIH. Ce vaccin a été bien toléré par les patients et a induit une réponse modérée des lymphocytes T spécifiques au VIH soutenant les essais cliniques de phase 2<sup>(120)</sup>.

Une formulation polymère à base de PEI a aussi été utilisée pour administrer un vaccin codant pour six régions des protéines gag. et pol. chez la souris. Ce vaccin a induit des lymphocytes T plurifonctionnels CD4+ et CD8+ à des niveaux relativement élevés qui ont persisté jusqu'à 22 semaines après l'administration.<sup>118</sup> Des ARNm couplés à des adjuvants ont aussi été testés afin d'améliorer les propriétés immuno-stimulatrices de l'ARNm. L'adjuvant « TriMix® » est une combinaison d'ARNm codant pour trois protéines d'activation du système immunitaire : CD70, le ligand CD40 (CD40L) et la protéine TLR4 il sert d'adjuvant. Cet adjuvant a été couplé à un ARNm qui code pour 16 fragments de protéines structurelles du VIH (Gag, Pol, Vif et Nef). Lors d'une injection intra nodale chez la souris, de puissantes réponses de lymphocytes T ont été détectées. Sur la base des essais cliniques de phase I et II, ce vaccin s'est avéré sûr et montre des résultats prometteurs<sup>(121, 122)</sup>.

Au travers de nombreux essais, il est désormais établi qu'un vaccin à lui seul ne suffirait pas à guérir le VIH. Alors, l'attention s'est portée sur la combinaison des vaccins avec d'autres traitements, attaquant le virus sur plusieurs cibles. Une stratégie qui a retenu l'attention ces dernières années est la combinaison de vaccins thérapeutiques avec des agents d'inversion de latence (LRA) et des anticorps bloquants. Les LRA sont des substances qui réactivent le virus, le rendant visible pour l'attaque du système immunitaire. Des anticorps bloquants dirigés contre le virus ou les récepteurs utilisés par le virus pour pénétrer dans les cellules sont utilisés pour limiter la propagation du virus une fois la latence inversée. C'est sur cette base que des stratégies vaccinales basées sur l'ARNm pourront certainement voir le jour à l'avenir<sup>(123)</sup>.

Des essais avec une combinaison de plusieurs thérapeutiques ont déjà commencé. Par exemple, le projet HIVACAR étudie une stratégie combinée sur des patients infectés par le VIH-1 dans un essai clinique de phase I et II. L'approche thérapeutique consiste en un vaccin personnalisé à ARNm, un anticorps bloquant contre CD4 et un agent inverseur de latence. Le vaccin étudié comprendra une sélection des meilleurs épitopes de chaque participant, en fonction du réservoir VIH-1 et des allèles HLA-I de chaque patient<sup>(123)</sup>. Ces résultats sont très prometteurs, mais soulignent également la nécessité de stratégies supplémentaires pour promouvoir la durabilité des anticorps dans la prophylaxie ou le traitement à long terme de l'infection chronique par le VIH-1.

## **2.3. Vaccins ARNm : qu'en est-il des autres pathologies infectieuses?**

La grippe et le VIH sont très étudiés en raison de leur part potentielle de marché important, mais la recherche sur les ARNm s'applique à bien d'autres pathologies infectieuses.

### **2.3.1. D'autres virus ; les flavivirus**

Le genre Flavivirus comprend plus de 70 membres, dont plusieurs sont considérés comme des agents pathogènes humains importants. Ils présentent un large spectre de maladies, dont des maladies systémiques impliquant des hémorragies (virus de la dengue et de la fièvre jaune) et des complications neurologiques (virus du Nil occidental et du virus Zika). Ces virus sont transmis par des arthropodes et peuvent être transmis horizontalement entre les arthropodes, permettant une persistance à long terme et la possibilité d'une ré émergence<sup>(124, 125)</sup>.

Les vaccins à ARNm sont donc aussi étudiés dans la prise en charge de ces infections à flavivirus, tels que le virus Zika, la dengue ou encore l'encéphalite japonaise. La majeure partie de ces vaccins est conçue en utilisant les antigènes de protéines de structure membranaire (prM) et protéines d'enveloppe (ENV).

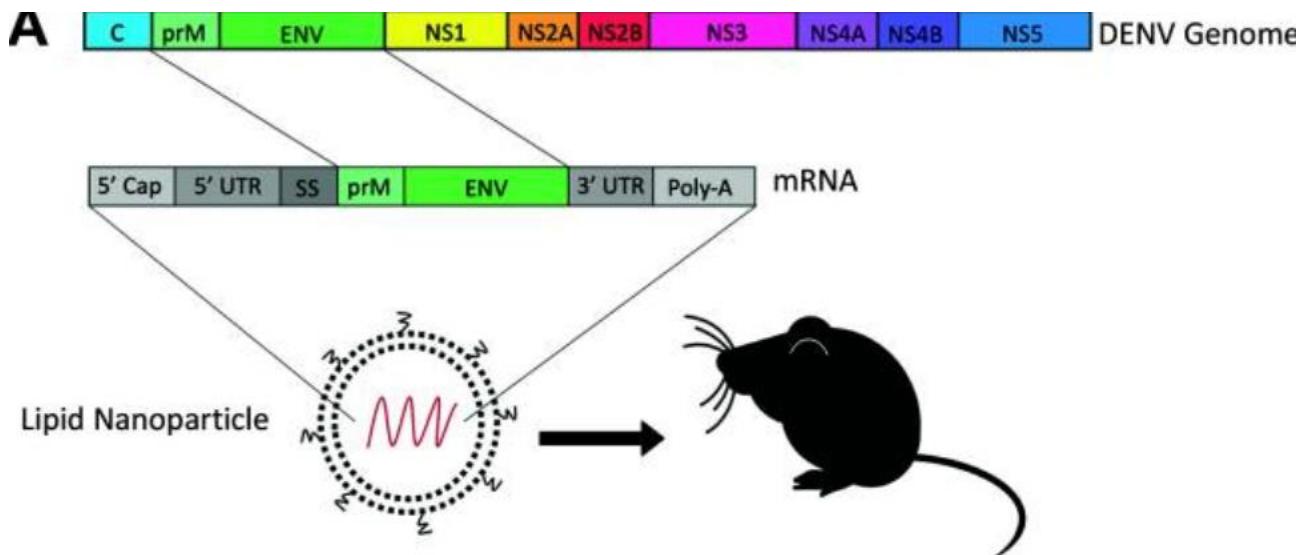


Figure 24: construction d'un vaccin ARNm-LNP codant les protéines prM et ENV<sup>(125)</sup>.

### a) Virus Zika

L'infection par le virus Zika est répandue en Asie et en Afrique et continue de prendre du terrain. Ainsi, elle émerge aussi en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Cette infection peut être fatale pour l'Homme et être à l'origine de malformations chez le fœtus (microcéphalie). Il n'existe ni vaccin, ni médicaments spécifiques à cette maladie.

Un vaccin à ARNm modifié encapsulé par LNP codant pour les protéines prM/ENV du ZIKA a été testé chez la souris. Celui-ci a montré une protection complète chez les souris immunocompétentes et immunodéprimées d'une provocation mortelle. De plus, comparativement aux vaccins inactivés contre le ZIKA, la réponse des lymphocytes T CD8+ et CD4+ s'est montrée plus importante<sup>(126, 127)</sup>. Enfin, chez l'homme, les données d'un essai clinique de phase I/II ont montré que le vaccin ZIKA à ARNm-1893 codant pour les protéines structurelles prME induisait plus de 90 % de séroconversion lors d'une vaccination de rappel avec des doses de 10 ug. Ce dernier a été bien toléré et a induit de fortes réponses sériques spécifiques au virus Zika après deux doses, quel que soit le statut sérologique initial du patient.

Il faut préciser que ce vaccin ARN auto-amplifié a obtenu une immunité protectrice uniquement lorsque l'ARN était formulé avec un support lipidique ou un dendrimère et injecté en intra musculaire. Ce qui souligne l'importance de la formulation et du site d'injection pour l'efficacité du vaccin<sup>(128)</sup>.

### b) Virus de la dengue

Des recherches sur le virus de la dengue ont aussi été menées, car il n'existe pas non plus de traitement spécifique à cette infection. Avec le virus de la dengue, on retrouve aussi le phénomène d'ADE, que l'on a pu voir avec le VIH. De cette manière, les anticorps produits en réponse à une infection ou à une vaccination sont capables de contribuer à l'aggravation de la maladie lors d'infections ultérieures. C'est donc un phénomène à prendre en compte dans la création d'un vaccin, car il ne faut pas que ce dernier exacerbé l'infection. Dans cet essai l'ARNm a été modifié et une construction distincte contenant des substitutions d'acides aminés a permis de réduire ce risque d'ADE<sup>(129)</sup>.

Ce vaccin ARNm-LNP codant pour les protéines PrM et E a été testé chez la souris, selon un calendrier de vaccination en trois injections avec 10 µg d'ARNm par dose. Ce dernier a provoqué des réponses en anticorps neutralisants après une dose unique, la dose secondaire a permis d'augmenter les titres, tandis que la troisième dose n'a pas amélioré de manière significative les titres d'anticorps. Un calendrier de vaccination à deux doses et un rappel pourrait alors être utilisé dans les études cliniques futures. Cette étude ouvre la voie au développement futur de vaccins à ARNm contre les sérotypes restants du virus de la dengue, dont le but sera de développer un vaccin tétravalent qui suscitera une réponse immunitaire équilibrée et protectrice contre les quatre sérotypes du virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4).

En conclusion, aujourd'hui, les principaux efforts de vaccination reposent sur des virus vivants atténus, mais ces vaccins ne parviennent pas à induire une réponse immunitaire suffisante ni à éviter l'ADE. C'est pourquoi les vaccins à ARNm tendent à être étudiés de plus en plus, car ils permettent la modification des séquences d'ARNm pour limiter ce phénomène<sup>(125)</sup>.

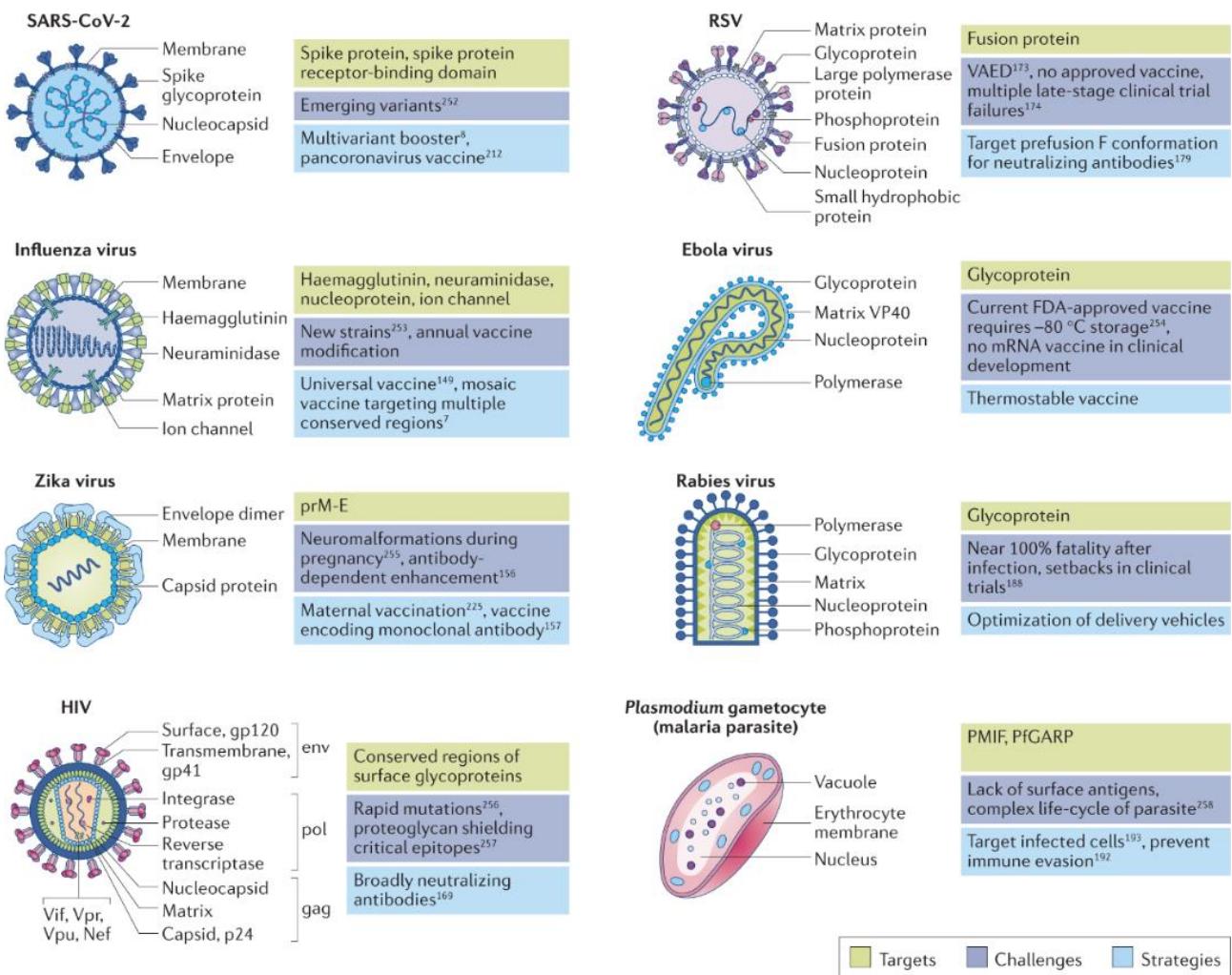


Figure 25: Protéines couramment utilisées par les vaccins à ARNm pour cibler les virus<sup>(11)</sup>

### 2.3.2. Développement de vaccins contre les parasites

S'agissant des infections parasitaires, des options de traitement spécifiques telles que les médicaments antihelminthiques, antitrypanosomiens et autres médicaments antiparasitaires sont disponibles sur le marché. Cependant, comme pour les autres infections, ces médicaments possèdent des effets indésirables, ont un coût important dans les régions endémiques et font face à des résistances. C'est pourquoi, il y a un besoin urgent de nouvelles thérapies, sous la forme de vaccins contre les infections parasitaires à haute prévalence, telles que le paludisme, la leishmaniose, la maladie de Chagas, l'ankylostomiasis et la schistosomiasis.

### 2.3.3. Application contre le paludisme

Le paludisme est une maladie infectieuse qui illustre bien le défi technologique que représente la réalisation d'un vaccin contre les parasites. C'est une maladie potentiellement mortelle et transmise par les moustiques du genre Anophèle. La stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme (2016-2030) a pour objectif de réduire de 90 % les incidents de paludisme et les taux de mortalité dans le monde<sup>(130)</sup>.

#### a) Les traitements actuels

Plusieurs molécules antipaludiques sont utilisées en prophylaxie ou en thérapeutique associées à la lutte anti vectorielle. Il existe de nombreux traitements sur le marché. On trouve des thérapies combinées à base d'artémisinine (Artemisinin-based combination therapy) ACT qui sont utilisés dans les thérapies des paludismes simples. (*Figure 26, Figure 27*)

- Arthemeter et luméfantrine,
- artesunate et amodiaquine,
- artesunate et mefloquine,
- artesunate sulfadoxine-pyriméthamine,
- dihydroarthemisinine et piperaquine

Le traitement de l'infection à *Plasmodium falciparum* sévère reste l'artésunate. Des traitements chimiprophylactiques sont aussi disponibles tels que : malarone® (atovaquone+proguanil), lariam®(mefloquine), doxycycline, Nivaquine® (chloroquine)<sup>(131)</sup>.

### Treating uncomplicated *P.falciparum* malaria

#### ***Treatment of uncomplicated P.falciparum malaria***

Treat children and adults with uncomplicated *P.falciparum* malaria (except pregnant women in their first trimester) with one of the following recommended ACTs:

- artemether + lumefantrine
- artesunate + amodiaquine
- artesunate + mefloquine
- dihydroartemisinin + piperaquine
- artesunate + sulfadoxine–pyrimethamine (SP).

*Strong recommendation, high-quality evidence*

Figure 26: Recommandation de la prise en charge de l'infection à *Plasmodium falciparum* non compliqué d'après l'OMS (organisation mondiale de la santé)<sup>(132)</sup>

## Treating uncomplicated *P.falciparum* malaria in special risk groups

### **First trimester of pregnancy**

Treat pregnant women with uncomplicated *P.falciparum* malaria during the first trimester with 7 days of quinine + clindamycin.

*Strong recommendation, very low-quality evidence*

### **Infants less than 5kg body weight**

Treat infants weighing < 5 kg with uncomplicated *P.falciparum* malaria with an ACT at the same mg/kg bw target dose as for children weighing 5 kg.

*Strong recommendation, very low-quality evidence*

### **Patients co-infected with HIV**

In people who have HIV/AIDS and uncomplicated *P.falciparum* malaria, avoid artesunate + SP if they are also receiving co-trimoxazole, and avoid artesunate + amodiaquine if they are also receiving efavirenz or zidovudine.

*Good practice statement*

### **Non-immune travellers**

Treat travellers with uncomplicated *P.falciparum* malaria returning to non-endemic settings with an ACT.

*Strong recommendation, high-quality evidence*

### **Uncomplicated hyperparasitaemia**

People with *P.falciparum* hyperparasitaemia are at increased risk of treatment failure, severe malaria and death so should be closely monitored, in addition to receiving an ACT.

*Good practice statement*

Figure 27: Recommandation de la prise en charge dans l'infection à plasmodium des groupes à risque d'après l'OMS (organisation mondiale de la santé)<sup>(132)</sup>

Enfin, il existe sur le marché un vaccin RTS, S/AS01 (Mosquirix®) contre le *Plasmodium falciparum*. C'est un vaccin recombinant qui comprend des régions de la protéine de surface du sporozoïte de *Plasmodium falciparum* appelé circumsporozoïte (CSP) (le sporozoïte est la forme infestante du parasite inoculé à l'homme par l'anophèle). Le deuxième antigène est la protéine de surface HBs du virus de l'hépatite B<sup>(133)</sup>. L'agence européenne du médicament (EMA) a émis un avis favorable pour l'utilisation chez les enfants âgés de 6 semaines à 17 mois qui vivent en zone d'endémie pour les protéger contre le paludisme à *Plasmodium falciparum*, mais aussi contre l'hépatite B. Tandis que l'OMS recommande un schéma de 4 doses de RTS,S/AS01 pour la prévention du paludisme à *Plasmodium falciparum* chez les enfants à partir de 5 mois vivants dans des régions à transmission modérée à éléver du paludisme, avec un schéma facultatif de 5 doses pour les zones à forte transmission saisonnière<sup>(133)</sup>.

Le vaccin Mosquirix® a montré un succès significatif dans la réduction des cas de paludisme graves et dans la réduction de la mortalité infantile, et actuellement, plus d'un million d'enfants vivant dans des zones à transmission du paludisme ont reçu le vaccin, marquant ainsi son utilisation généralisée. Cependant, Mosquirix® a rencontré certaines limites, notamment une efficacité moindre dans des groupes d'âge spécifiques autres que les enfants, un manque de réponses immunitaires durables et la nécessité de trois à quatre doses de rappel pour obtenir une efficacité raisonnable. Par conséquent, la recherche d'un vaccin antipaludique plus robuste et plus efficace se poursuit<sup>(134)</sup>.

### b) Pourquoi la réalisation d'un vaccin antiparasitaire semble si difficile ?

La réalisation de vaccins contre les parasites n'est, en effet, pas si aisée ; d'une part, parce que les parasites sont dotés de génomes vastes et complexes qui remettent en question les succès des programmes de vaccination. En outre, ces programmes sont plus souvent dédiés au développement de vaccins contre les infections bactériennes et virales à « petit génome ». D'autre part, de nombreux parasites présentent des cycles de vie complexes et développent des stratégies d'échappement au système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes d'échappement souvent mal connus et la coévolution entre les parasites et leurs hôtes les ont rendus capables d'établir des infections chroniques. Ainsi, les plateformes vaccinales traditionnelles ne sont pas adaptées, en raison de la complexité des cycles et de leur capacité à échapper au système immunitaire humain<sup>(135)</sup>.

Enfin, les infections parasitaires touchent principalement des régions à faible pouvoir économique, ce qui n'incite pas les laboratoires à investir dans de nouvelles technologies. De plus, les populations vivant dans ces régions ne bénéficient pas de conditions d'hygiène et de traitement d'eau suffisant.

### c) Cibles en cours de recherche pour le développement d'un vaccin à ARNm

En premier lieu, il est important de détailler le cycle du parasite. Chez l'hôte, les parasites Plasmodium sont présents sous différentes formes, à commencer par la forme sporozoïte inoculée lors d'un repas de sang d'un moustique anophèle femelle infecté dans la peau de l'hôte humain. Par la suite, les sporozoïtes envahissent les hépatocytes du foie, où ils mûrissent, se répliquent et libèrent des formes de merozoïtes, qui finissent par envahir les globules rouges, où ils se transforment du stade des anneaux et des trophozoïtes au stade des schizontes. Les schizontes rompus libèrent des merozoïtes qui peuvent infecter de nouveau des cellules sanguines.<sup>134</sup> Dans le cycle de vie du parasite les merozoïtes infectent les globules rouges or ces derniers n'expriment pas les molécules du CMH de classe I à leur surface, échappant ainsi à la reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. De plus, au cours de ce stade, il y a la production de protéines d'adhésion, entraînant une séquestration des erythrocytes infectés dans l'endothélium vasculaire. Cela ralentit ainsi leur clairance et les séquestre dans la micro-vascularisation de divers organes. Par ailleurs, plusieurs gènes codent pour ces protéines d'adhésion, mais une seule apparaît à la fois à la surface du globule rouge. Ces protéines sont alors présentées tour à tour rendant le système de reconnaissance de l'hôte inefficace. Enfin, l'expression de protéines antigéniques différentes en fonction du stade de développement du parasite, aident à les camoufler du système immunitaire de l'hôte<sup>(135)</sup>.

Tirant parti des récentes réalisations en matière de développement et de la connaissance du cycle de vie du parasite, la technologie de l'ARN auto-amplifié devient de plus en plus étudiée. Par exemple, cette technologie a été utilisée pour le développement d'un vaccin ciblant le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (**PMIF**) de Plasmodium, qui est sécrété par le parasite et sert à supprimer la réponse inflammatoire de l'hôte à l'infection, en particulier en ciblant la réponse des lymphocytes T. Chez la souris, il a été observé qu'après les vaccinations, les cellules CD4+ spécifiques du PMIF étaient augmentées. Le titre d'IgG anti-PMIF était multiplié par quatre et bloquait l'action pro-inflammatoire du PMIF sans altérer la

fonctionnalité du MIF de l'hôte. De plus, cette étude a montré que la vaccination avec l'ARNm du PMIF améliorait le contrôle des parasites en fournissant une défense contre les infections au stade hépatique et sanguin et empêchait la réinfection. Au vu de ces résultats, il est possible qu'à l'avenir, des essais sur le l'Homme soient menés<sup>(134, 5)</sup>. Une deuxième étude portant aussi sur un vaccin ARNm auto-amplificateur codant pour le PMIF a été réalisée. Ce dernier était vectorisé dans une nano émulsion cationique à base de squalène. Deux doses de vaccin de 15 µg ont amélioré le développement des lymphocytes T auxiliaires et ont provoqué des anticorps IgG anti-*Plasmodium* et des réponses des lymphocytes T mémoire<sup>(11)</sup>.

Très récemment, un vaccin à ARNm auto-amplificateur internalisé dans des liposomes cationiques a été développé, ciblant l'homologue de liaison aux réticulocytes de *Plasmodium falciparum* 5 (**PfRH5**). Les souris immunisées avec le vaccin ont produit des anticorps qui ont reconnu la protéine native exprimée dans les extraits de schizontes de *Plasmodium falciparum* et ont inhibé la croissance du parasite in vitro<sup>(134)</sup>.

Une autre étude de l'infection paludéenne a identifié une protéine : la protéine riche en acide glutamique de *Plasmodium falciparum* (**PfGARP**) comme cible potentielle du vaccin ARNm. Cette protéine a été découverte, car elle s'avère être la cible des anticorps des enfants résistants au *Plasmodium falciparum*. Le PfGARP est exprimé à la surface des globules rouges infectés. Cette découverte a incité au développement d'un vaccin à ARNm modifié par un nucléoside encapsulé dans un LNP. Trois doses de 50 µg ont permis de réduire la parasitémie chez les singes Aotus après une provocation par *Plasmodium falciparum*<sup>(11)</sup>.

D'autres vaccins contre le *Plasmodium falciparum* ont été testés en utilisant le Pfs25 et PfCSP comme cible conditionnée dans des LNP. Le PfCSP est la protéine circumsporozoïte de *Plasmodium falciparum* (**PfCSP**). La PfCSP est une protéine exprimée sur le sporozoïte infectieux, elle contribue à la motilité du parasite et à l'invasion des hépatocytes. La Pfs25, quant à elle, est une protéine riche en cystéine. Elle est exprimée à la surface des ookinètes qui se développeront en oocystes dans l'intestin moyen du moustique. Les oocystes conduisent au stade sporozoïte infectieux responsable de la transmission du paludisme à l'hôte<sup>(136)</sup>.

L'efficacité et la sécurité d'un vaccin combinant ces deux antigènes ont donc été testées. Les vaccins ont réussi à induire des réponses immunitaires. Les IgG purifiées provenant de souris immunisées contre l'ARNm-LNP Pfs25 se sont montrées efficaces pour réduire la transmission du paludisme aux moustiques. De plus, les souris après trois et quatre immunisations avec l'ARNm-LNP PfCSP ont montré une protection contre la provocation par les sporozoïtes. Cette approche combinée, utilisant des vaccins qui ciblent à la fois le stade infectieux et les stades sexuels/intestinaux du paludisme, devrait jouer un rôle crucial dans la perturbation de la transmission du paludisme<sup>(134, 136)</sup>. Il est à noter que BioNTech, a annoncé le début des essais cliniques de vaccins à ARNm ciblant le paludisme. Plus précisément, la société BioNTech a déjà développé le vaccin BNT165b1, une nanoparticule d'acide ribonucléique (ARN)-lipidique (LNP) codant pour une partie du PfCSP et l'essai clinique de phase I visant à évaluer sa sécurité, la tolérance et son immunogénicité a déjà été programmée<sup>(136)</sup>. Le développement doit se poursuivre dans le but de générer un vaccin contre le paludisme présentant une efficacité et une durée de protection élevée. À cet égard, l'engagement des ressources nécessaires telles que l'approbation réglementaire, la mise en œuvre et le financement devient de plus en plus important pour éliminer le paludisme<sup>(134)</sup>.

## **2.4. Rôle dans la lutte à l'antibiorésistance<sup>(137)</sup>.**

La résistance aux antibiotiques représente l'une des plus grandes menaces pour la santé humaine. Des cas de résistance aux antibiotiques sont constamment signalés et le temps nécessaire aux bactéries pour devenir résistantes aux antibiotiques nouvellement introduits est de plus en plus court. Une multitude de mécanismes concourent à l'émergence de micro-organismes résistants. D'une part, il y a la résistance naturelle du pathogène, c'est la capacité bactérienne à bloquer la fonction antibiotique en raison de caractéristiques structurelles ou fonctionnelles inhérentes. Par exemple la vancomycine qui n'est généralement pas efficace contre les bactéries Gram négatives en raison de son incapacité à traverser la membrane externe. Puis, il existe des résistances acquises qui reposent sur l'acquisition de nouvelles fonctions. Plusieurs mécanismes sont décrits, comme ; l'inactivation du médicament par hydrolyse, réduction de la perméabilité membranaire ou la surexpression des pompes à efflux. Par exemple la production de β-lactamases qui inhibent l'effet des β-lactamines tels que les pénicillines ou les céphalosporines.

Dans ce contexte où la résistance aux antibiotiques constitue une préoccupation majeure en matière de santé publique, des vaccins ARNm font l'objet de recherche afin de limiter l'utilisation des antibiotiques. Aussi, comme indiqué sur la *figure 28*, le nombre de décès causés par les bactéries RAM (résistantes aux antimicrobiens) représentait déjà 700 000 décès dans le monde en 2019. Ces agents apparaissent et réapparaissent rapidement et de manière imprévisible. C'est dans ce sens que les vaccins ARNm pourraient apporter une réponse en codant plusieurs antigènes dans une seule construction.

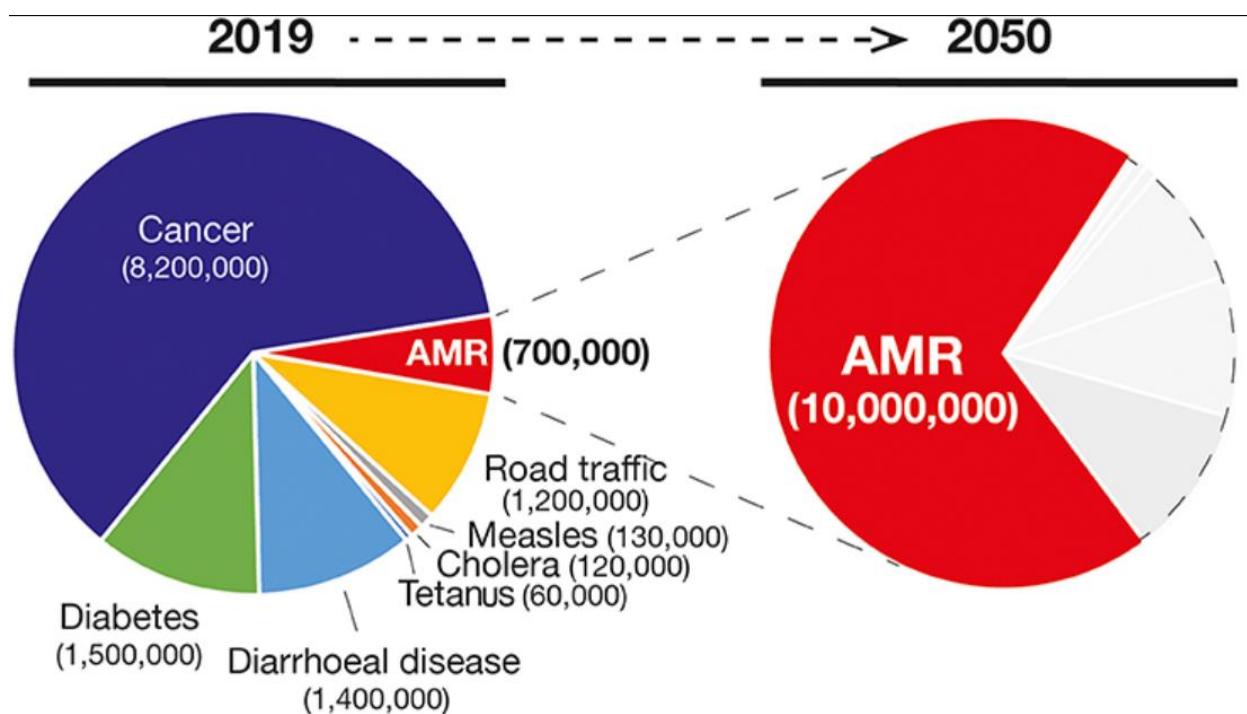


Figure 28: Nombre de décès et principales causes (à gauche) en 2019 et projection du nombre de décès dus aux infections par RAM (bactéries résistantes aux antimicrobiens) en 2050 (en rouge à droite)<sup>(137)</sup>

#### 2.4.1. Application à *Staphylococcus aureus*

Le staphylocoque doré est l'une des bactéries les plus étudiées pour le développement d'un vaccin ARNm. *Staphylococcus aureus* (SA) est une bactérie à Gram positif, en forme de Cacci. SA s'adapte très bien à différents milieux, puisqu'il est estimé entre 25 et 30% le nombreux d'individus en bonne santé hébergeant la bactérie. Toutefois, cette bactérie est responsable de dizaines de milliers d'infections chaque année (pneumonies, infections nosocomiales, infections articulaires...). L'utilisation impulsive d'antibiotiques a conduit à l'émergence et à l'expansion de bactéries résistantes aux antibiotiques. Par exemple, SA résistant à la méticilline

(SARM) et SA résistant à la vancomycine (VRSA) ont tous deux été découverts peu de temps après l'application clinique de ces antibiotiques<sup>(138)</sup>. C'est en ce sens que plusieurs études essaient de montrer l'intérêt des vaccins à ARNm comme solution alternative aux antibiotiques. Des études *in silico* ont d'abord été menées dans le but d'identifier « les gènes de virulence » de SA. Le séquençage de ces gènes a ensuite été utilisé pour construire une structure protéique chimérique qui a servi de base au modèle pour la création d'un vaccin ARNm. Ce vaccin a ensuite été validé par diverses simulations *in silico*, et ses propriétés immunologiques ont été analysées à l'aide de techniques d'immuno-informatiques. Les résultats de cette étude montrent que ce vaccin pourrait provoquer une réponse immunitaire robuste contre le staphylocoque. Mais, d'autres études, notamment des essais *in vivo* et *in vitro*, sont nécessaires pour évaluer pleinement l'efficacité de ce modèle<sup>(139, 140)</sup>.

#### 2.4.2. Application aux Streptocoques

Le staphylocoque n'est pas la seule bactérie pour laquelle des études ont montré des résultats probants. En effet, un vaccin SAM (ARNm auto-réPLICATIF) a été testé *in vivo* contre les streptocoques du groupe A et du groupe B. Les streptocoques A (*Streptococcus pyogenes*) responsable d'infections fréquentes bénignes telles que l'angine et l'impétigo, mais également responsable d'infection plus grave comme des bactériémies, des infections cutanées, des méningites... Les streptocoques du groupe B (*Streptococcus agalactiae*) responsable d'infections néo-natales précoces ou tardives. Les B-lactamines sont à l'heure actuelle le traitement de référence des infections à streptocoque pour lesquelles on trouve une augmentation des résistances bactériennes. À ce jour aucun vaccin n'est disponible sur marché pour prévenir de ces infections.

Les vaccins ARNm semblent avoir leur place, car il existe une bonne connaissance du génome des streptocoques. De plus, plusieurs antigènes ont déjà été étudiés. Il existe des antigènes « solubles » tels que la streptolysine O qui lyse la membrane des cellules sanguines et suscite la formation d'anticorps « antistreptolysines O » (**ASLO**). Puis, il existe d'autres protéines immunogènes tels que les pili ancrés à la surface des streptocoques. C'est sur cette base qu'un vaccin SAM codant pour la streptolysine-O et la protéine du squelette de l'ilot pilus 2a (BP-a) du streptocoque du groupe A et du groupe B s'est révélé immunogène chez la souris, induisant une réponse humorale et cellulaire<sup>(137)</sup>.

À ce jour aucun vaccin n'est approuvé chez l'homme. Les outils immuns informatiques continuent d'être explorés et de nombreux travaux sur la formulation des ARNm restent à envisager avant de trouver la structure qui permettra une réponse immunitaire suffisante et durable. Bien que cela soit plus complexe et actuellement moins développé que les vaccins vitaux, la recherche dans ce domaine pourrait ouvrir de nouvelles voies pour prévenir les infections des bactéries résistantes aux médicaments<sup>(141)</sup>.

### **3. Oncologie : Nouvelle thérapeutique ou traitement adjuvant dans la prise en charge des cancers ?**

Le domaine des thérapies à base d'ARNm suscite beaucoup d'intérêt en oncologie. Les traitements à base d'ARNm visent à stimuler le système immunitaire pour reconnaître et attaquer les cellules et les tissus cancéreux. L'avantage serait de mettre au point des vaccins personnalisés en fonction du cancer à traiter, du sous-type, et des antigènes majoritaires retrouvés chez le patient. Ainsi le système immunitaire du patient pourrait reconnaître et détruire les cellules cancéreuses.

Avec cette thérapeutique, les effets secondaires à prévoir sont peu importants, de plus les ARNm peuvent être utilisés en association avec d'autres antinéoplasiques et peuvent alors réduire le risque de rechute. Cependant, pour une application *in vivo* des ARNm contre le cancer, il faut s'assurer que la réponse immunitaire soit suffisamment forte, mais aussi suffisamment contrôlée pour éviter des effets secondaires graves. De plus la personnalisation des thérapeutiques pourrait rendre les vaccins ARNm plus couteux et leur temps de fabrication plus chronophage<sup>(142)</sup>.

#### **3.1. Présentation de la cellule cancéreuse et de son micro-environnement**

Le développement des vaccins à ARNm en oncologie reste très complexe, car il est nécessaire de prendre en compte le micro-environnement créé par la tumeur. Ce micro-environnement comprend toutes les cellules hôtes non cancéreuses de la tumeur, notamment les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires adaptatives et innées, ainsi que ses composants non cellulaires, notamment la matrice extracellulaire (MEC) et les produits solubles ; les chimiokines, les cytokines, les facteurs de croissance et les vésicules extracellulaires. Le micro-environnement est alors capable de s'adapter afin d'améliorer la survie de la tumeur, par conséquent le micro-environnement tumoral peut créer un milieu immunosuppressif, ce qui réduit l'efficacité des vaccins ARNm<sup>(143)</sup>. Des cellules comme les macrophages associés aux tumeurs, ou des cellules T régulatrices peuvent aussi inhiber l'action du système immunitaire.

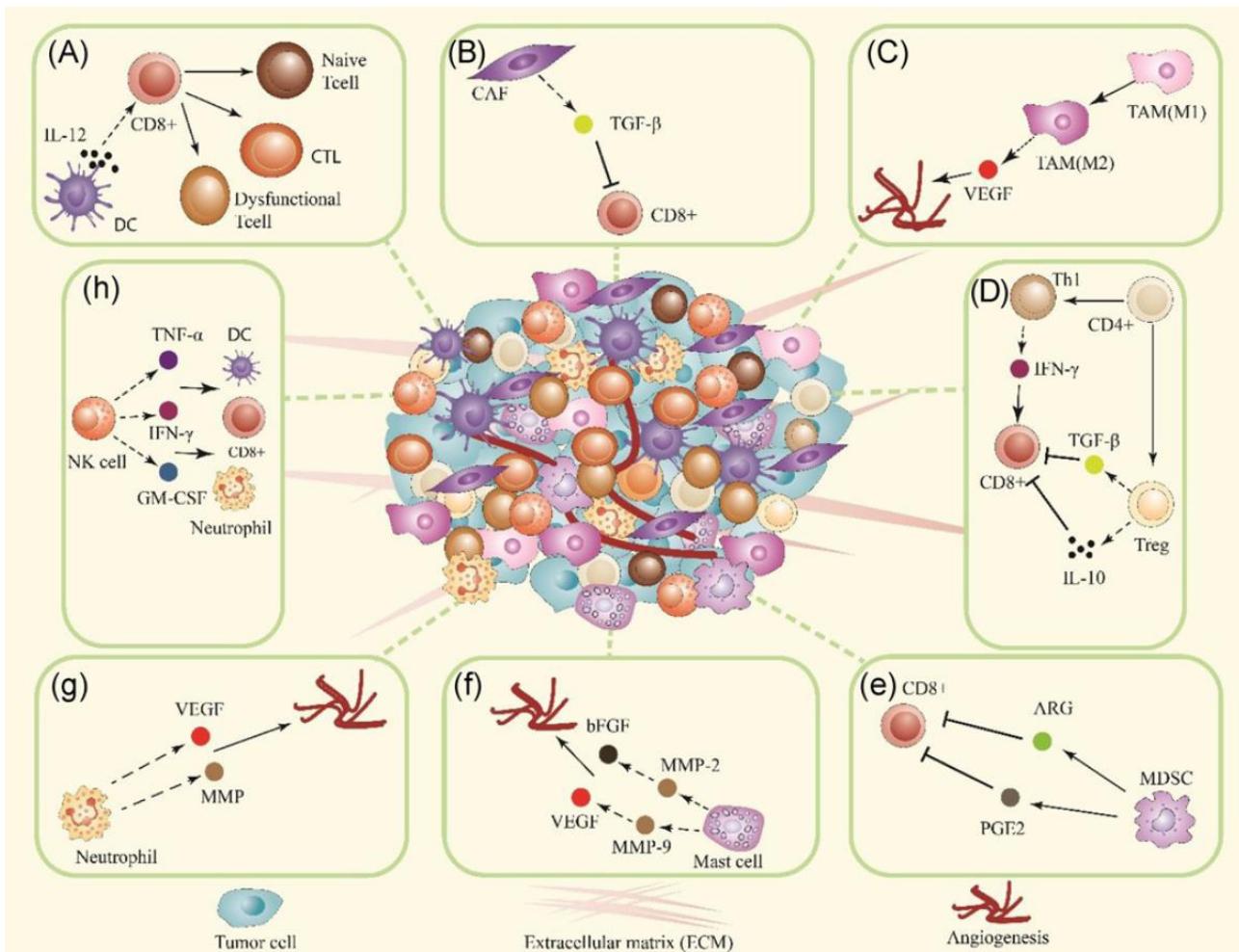


Figure 29: Micro-environnement tumoral ; différentes populations cellulaires<sup>(144)</sup>

Sur la figure 29, on peut voir les différents rôles des populations cellulaires induites par le micro-environnement tumoral dans la progression du cancer.

Certaines cellules vont alors inhiber l'action et l'infiltration des lymphocytes T CD8+, telles que les fibroblastes associés aux cancers (**CAF**), les cellules suppressives d'origine myéloïde (**MDSC** : *myeloid-derived suppressor cells*). D'autres, comme les lymphocytes T CD4+ peuvent jouer des rôles immun activateurs ou immunsupresseurs grâce à la différenciation en lymphocytes T auxiliaires de type 1 (**Th1**) et en lymphocytes T régulateurs (**Treg**). Th1 est capable d'induire les lymphocytes T CD8+, tandis que les lymphocytes T régulateurs ont une activité immunsuppressive. D'autres cellules bloquent l'action des lymphocytes T en participant à l'angiogenèse grâce à la sécrétion du facteur de croissance endothéial vasculaire (**VEGF**). On trouve les **TAM** (*tumor associated macrophage/macrophages associés aux tumeurs*), les mastocytes (*Mast cell*), et les neutrophiles. Cet environnement

immunosuppressif créer alors des barrières physiques qui limitent la pénétration des traitements anti cancéreux, mais aussi la pénétration des cellules immunitaires ou des vaccins ARNm injectés en intra-tumoral<sup>(145)</sup>.

Plus précisément, les TAM jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de l'inflammation chronique, associée à la progression tumorale. En effet, les TAM sont capables de secréter des cytokines, comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-23, qui favorisent la croissance et la progression dans différents types de cancer tel que le cancer colorectal<sup>(145)</sup>. Leur rôle dans la progression des tumeurs ne s'arrête pas à la sécrétion de cytokines, ils sécrètent aussi des facteurs pro-angiogéniques (VEGF), expriment des niveaux élevés de ligands de point de contrôle immunitaire (tel que PD-L1, PD-L2.) et sécrètent le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ). Les points de contrôle aussi appelé « *checkpoint* » permettent à la tumeur de se protéger des attaques du système immunitaire. L'interaction entre le ligand PD-1 et son récepteur PD-L1 permet aux cellules cancéreuses d'inhiber l'action des lymphocytes T. Enfin, les TAM peuvent recruter des lymphocytes T régulateurs (T-reg).

Enfin au niveau génétique, les tumeurs présentent une hétérogénéité c'est-à-dire que les caractéristiques génétiques et comportementales au sein d'une même tumeur peuvent varier considérablement. Cette instabilité génétique leur permet de muter rapidement et donc d'échapper aux traitements conventionnels. S'agissant des vaccins ARNm, ces mutations induisent des modifications d'antigènes rendant le développement de vaccin plus complexe. Cette hétérogénéité conduit à des réponses variables aux thérapies parmi les individus atteints de cancers du même sous-type de tumeur et est considérée comme l'une des principales causes de progression de la maladie et d'échec du traitement. De plus, en règle générale, seule une petite fraction d'un échantillon est retenue pour la conception d'un vaccin contre le cancer à ARNm, ce qui est peu susceptible de fournir des informations complètes sur le profil génétique de la tumeur. Cela contribue à accroître les incertitudes quant à l'efficacité clinique du vaccin contre le cancer à ARNm. Ainsi, l'hétérogénéité des tumeurs limite largement l'efficacité du vaccin ARNm contre le cancer. Afin de surmonter cette hétérogénéité, il faudrait échantillonner plusieurs points des tissus tumoraux. Cependant, ces stratégies augmentent non seulement la complexité de la conception et de l'administration des vaccins, mais augmentent également les coûts et la durée du traitement pour les patients. Une autre méthode prometteuse est l'utilisation d'algorithmes d'intelligence artificielle tels que la prédiction de liaison au CMH, la

quantification de l'expression du transcrit muté et la clonalité de la mutation pour prédire les néo antigènes sur la base des données génomiques de la tumeur, puis utilisées pour hiérarchiser ces mutations en tant que candidats vaccins en fonction de leur probabilité. Mais les applications de l'IA dans la conception de vaccins restent encore limitées, à l'avenir elle mériterait des investigations plus approfondies<sup>(146)</sup>.

Enfin, pour que les vaccins soient efficaces et non délétères pour les cellules saines, ils doivent cibler les antigènes spécifiques des cellules cancéreuses. Trouver ces antigènes fait alors parti des défis majeurs dans la formulation des vaccins. De plus, même si un vaccin induit une réponse immunitaire, il faut que la réponse soit suffisamment forte pour éliminer la tumeur, ce qui est presque impossible à la vue du micro-environnement immunosuppressif. C'est pourquoi la plupart des études menées sur les vaccins ARNm sont associées à un autre traitement qui modifie ce micro-environnement, permettant aux cellules T déclenchées par le vaccin de pénétrer dans le tissu tumoral<sup>(147)</sup>.

### **3.2. Cibles : exemple d'antigène associé aux tumeurs (TAAs) et antigènes spécifiques de la tumeur (TSA)**

Un candidat vaccin doit être spécifique aux cellules tumorales. Pour cela la sélection d'antigènes doit être étudiée. Les cibles immunogènes actuelles comprennent les antigènes associés aux tumeurs (TAAs) et les antigènes spécifiques de la tumeur (TSA).

#### **3.2.1. Les TAAs**

Les TAAs sont les antigènes les plus couramment ciblés, généralement exprimés sur les cellules normales, mais de manière très importante sur les cellules tumorales. Cela souligne leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques universelles. A noter qu'ils peuvent aussi être des auto-antigènes et peuvent donc être immunologiquement tolérés et affaiblir la puissance vaccinale. Les TAAs comprennent les néo-antigènes et les antigènes du cancer des testicules (CTA). Les néo-antigènes résultent d'altérations spécifiques à la tumeur, telles qu'une mutation génomique, un épissage anormal de l'ARN, une dérégulation de la modification post-traductionnelle et l'intégration de cadres de lecture ouverts viraux. Les mutations comprennent des variations de nucléotides uniques, des insertions, des délétions et des fusions de gènes. Les néo antigènes spécifiques d'une tumeur sont reconnus comme non-soi et peuvent provoquer une réponse immunitaire.

Les CTA, similaires aux néo antigènes, sont des TAAs qui jouent un rôle essentiel dans divers processus vitaux, notamment l'angiogenèse, la progression du cancer, l'anti-apoptose, la transition épithéliale vers mésenchymateuse, le métabolisme et la résistance aux médicaments anticancéreux. Les CTA ont été considérés comme des marqueurs tumoraux pronostiques potentiels et des cibles pour l'immunothérapie des tumeurs malignes<sup>(148)</sup>. Les antigènes associés aux tumeurs sont constamment identifiés grâce aux efforts massifs de séquençage du génome du cancer et aux progrès technologiques dans la prédiction des mutations tumorales immunogènes. Le vaccin à base d'ARNm a la flexibilité d'inclure plusieurs néo antigènes au sein de la même construction, et le choix du peptide antigène peut être personnalisé en fonction du spectre de mutation unique de chaque patient, rendant ainsi possible une médecine de précision<sup>(149)</sup>. (Figure 30, Figure 31)

TAAs	Function	Location	Refs
SPAG9	Angiogenesis	Cytosol, Perinuclear region	[18]
PAGE4	Antiapoptosis	Cytosol, Nucleus, Mitochondria	[19]
CT45A1	Promotes EMT	Nucleus, Cytosol	[20]
SSX1	Promotes EMT and cancer stem cell-like properties	Nucleus, Cytosol, Extracellular	[21]
SSX2	Promotes EMT	Nucleus, Cytosol, Extracellular	[22]
MAGEC2	Angiogenesis, EMT	Nucleus, Cytosol, Extracellular, Mitochondria	[23]
MAGEA3	Cancer metastasis	Nucleus, Cytosol, Extracellular, ER	[23]
MAGEA9	Cancer stemness	Nucleus, Cytosol, Extracellular, Mitochondria	[27]
PLAC1	Promotes tumor invasion and inhibit antitumor immunity	Extracellular, Cytosol, ER, Nucleus, Mitochondria	[28]
CAGE	Promotes anticancer drug resistance	Nucleus, Cytosol, Extracellular, Mitochondria	[29]
PRAME	Promotes resistance to TRAIL	Nucleus, Plasma membrane, Extracellular, Mitochondria	[30]
SEMG1 and SEMG2	Promotes glycolysis and respiration	Nucleus, Extracellular	[32]

Figure 30: Exemple de TAAs ainsi que leur fonction et leur localisation au sein de l'organisme<sup>(148)</sup>

Cancer Type	Study	Phase	Formulation	Route	Other Therapy
TNBC	NCT02316457	Phase I	LNP	i.v.	NA
Melanoma	NCT02035956	Phase I	Naked mRNA	i.n.	RBL001/RBL002
NSCLC	NCT03164772	Phase I/II	LNP	i.d.	Durvalumab, Tremelimumab
Solid tumors	NCT03289962	Phase I	Naked mRNA	i.v.	Atezolizumab
Solid tumors	NCT03313778	Phase I	LNP	i.d.	Pembrolizumab
Solid tumors	NCT03480152	Phase I/II	Naked mRNA	i.m.	NA
Solid tumors, lymphoma	NCT03468244	NN	Naked mRNA	s.c.	NA
Metastatic melanoma	NCT03815058	Phase II	LNP	i.v.	Pembrolizumab
High-risk of recurrence melanoma	NCT03897881	Phase II	NN	NN	Pembrolizumab
Esophageal cancer, NSCLC	NCT03908671	NN	LNP	s.c.	NA
Pancreas cancer	NCT04161755	Phase I	NN	NN	Atezolizumab, chemotherapy
NSCLC	NCT04267237	Phase I	LNP	i.v.	Atezolizumab
KRAS-mutant pancreas, colon and lung cancer	NCT03948673	Phase I	NN	i.m.	Pembrolizumab

Figure 31: Essais cliniques en cours utilisant les TAAs associés ou non à d'autres thérapeutiques<sup>(150)</sup>

Abréviations : *id*, intradermique ; *i.m.*, intramusculaire ; *i.n.*, intranodal ; *i.v.*, intraveineuse ; *LNP*, nanoparticule lipidique ; *NA*, sans objet ; *NN*, fréquence indéterminée, *NSCL*, cancer du poumon non à petites cellules ; *s.c.*, sous-cutanée ; *TAAs*, antigène associé à la tumeur ; *TNBC*, cancer du sein triple négatif.

### 3.2.2. Les TSA

Les TSA, quant à eux, représentent des antigènes spécifiques aux cellules tumorales présentant une forte immunogénicité et un degré élevé d'individualité et de diversité d'épitopes. Ils constituent donc des cibles idéales pour des vaccins personnalisés. Cependant, en raison du caractère unique des antigènes pour chaque patient et type de tumeur, une optimisation plus poussée doit être menée dans le but de réduire le coût et la complexité du vaccin TSA<sup>(151)</sup>. La stratégie de développement de vaccins personnalisés à ARNm a été décrite contre le cancer du pancréas et sert de modèle pour d'autres vaccins.

Dans un premier temps, la conception d'un vaccin personnalisé à ARNm contre le cancer du pancréas commence par l'identification de mutations non synonymes spécifiques à une tumeur en comparant les données de séquençage. Des prédictions informatiques des néo antigènes sont ensuite appliquées pour vérifier l'expression et prédire l'affinité de liaison des peptides générés sur les allèles du CMH. Actuellement, le criblage des gènes surexprimés et mutés est prometteur pour le bon développement de vaccins.

La prédiction des antigènes tumoraux évolue rapidement grâce aux progrès récents de la bio-informatique. En conséquence, une approche précise et sensible pour identifier des candidats puissants dans le cancer du pancréas individuel sera éventuellement établie pour développer ses vaccins personnalisés à ARNm<sup>(151)</sup>.

### **3.2.3. Les autres cibles en cours d'étude**

D'autres cibles sont aussi envisagées dans le développement des vaccins ARNm, ce sont les facteurs immuno-régulateurs. Ils sont capables de stimuler ou de supprimer des fonctions spécifiques des cellules immunitaires, telles que les cytokines, les ligands ou les récepteurs. Les vaccins à ARNm peuvent alors coder plusieurs facteurs et ainsi renforcer la réponse du système immunitaire en stimulant diverses voies. Dans des études récentes, les cytokines les plus couramment utilisées comprennent l'IL-2, l'IL-12 et l'OX40L. Il a été démontré que ces cytokines stimulent la prolifération des lymphocytes T et renforcent la réponse immunitaire antitumorale. De plus, le vaccin à ARNm codant pour les facteurs de stimulation immunitaire peut servir d'adjvant au vaccin à ARNm codant pour les TAAs ou les TSA<sup>(146)</sup>.

## **3.3. Réduire l'impact de l'environnement immunosuppressif produit par la tumeur, indispensable pour garantir l'efficacité d'un vaccin**

Une fois les antigènes d'intérêt identifiés en fonction du type et du sous-type de cancer, il faut trouver un moyen de limiter l'impact du micro-environnement créé par la tumeur. Ce dernier représentant un risque important d'échec pour la vaccination. Une des approches stratégiques pour garantir l'efficacité des vaccins est la combinaison avec d'autres traitements standards que ce soit la chimiothérapie conventionnelle, la radiothérapie ou l'immunothérapie. L'intérêt de ces combinaisons est d'avoir une synergie d'action afin d'améliorer l'efficacité des traitements et de limiter le risque de récidives<sup>(152, 153, 154)</sup>.

### **3.3.1. Combinaison avec des thérapies « conventionnelles »**

La radiothérapie induit une mort cellulaire mais améliore aussi le recrutement des cellules T ce qui fournit une justification pour la combinaison avec un vaccin ARNm. Aujourd'hui les données précliniques fournissent des preuves d'une synergie entre la radiothérapie et l'immunothérapie active. Quant à La chimiothérapie, elle peut être utilisée pour surmonter l'environnement tumoral pour améliorer les chances de succès des vaccins ARNm<sup>(152, 153, 154)</sup>.

Dans ce sens, des essais avec une combinaison ARNm et chimiothérapie classique ont aussi été réalisés. Par exemple le protocole OLIVIA est un premier essai clinique de phase 1 pour le traitement du cancer épithéial de l'ovaire. Le cancer épithéial de l'ovaire (COE) à un stade avancé est la principale cause de décès par tumeurs malignes gynécologiques avec une survie à 5 ans ne dépassant pas 40%. Actuellement, le traitement comprend de la chimiothérapie et de la chirurgie, mais la plupart des patients souffrent d'une rechute résistante à la chimiothérapie. Cet essai est composé d'un vaccin ARNm formulé dans des liposomes et ciblant trois TAAs (BNT115). Ce vaccin est étudié en combinaison avec un chimiothérapie adjuvante : carboplatine/paclitaxel. Les deux premières vaccinations de cet essai sont programmées avant le début de la chimiothérapie puis, les six rappels sont programmés environ 2 semaines après chaque cycle de chimiothérapie afin de limiter les effets immunsupresseurs<sup>(154)</sup>. Dans cette étude il a été démontré que cette stratégie provoque efficacement des réponses des lymphocytes T CD8+ et T CD4+ spécifiques à l'antigène contrairement au vaccin utilisé en monothérapie. De plus la tolérance du vaccin s'est avérée bonne. Les effets indésirables majeurs retrouvés sont ceux connus comme un syndrome pseudo grippal, fatigue, nausée... Ces évènements ont été gérés par l'administration d'antipyrétiques et d'analgésiques sans utilisation de corticostéroïdes. La non-utilisation de corticostéroïdes comme la dexaméthasone (très utilisée en oncologie) est un point important, car il a été montré chez la souris que la dexaméthasone qui soutient une activité immuno-suppressive réduit l'efficacité d'une immunothérapie tel que l'utilisation des vaccins ARNm<sup>(154)</sup>. En conclusion, le BNT115 est destiné à être développé comme un vaccin thérapeutique contre le cancer pour le traitement du cancer de l'ovaire épithéial et pourrait être prometteur. L'inclusion de nouveaux patients est en cours<sup>(154)</sup>.

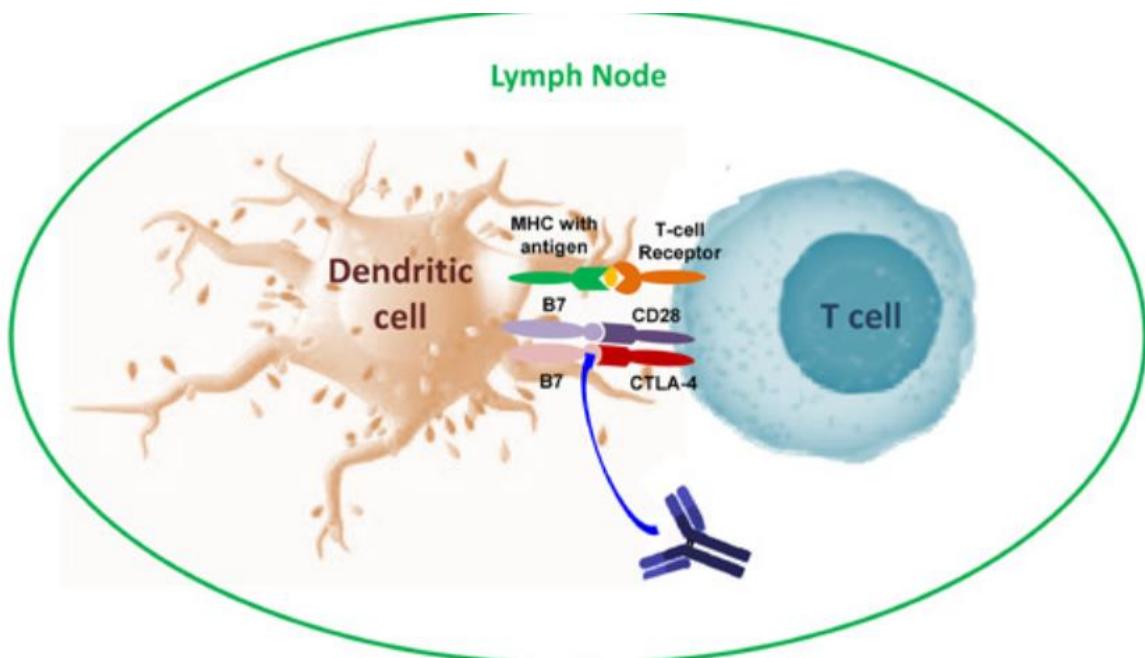
Un autre exemple est celui du CV9202 combinant une radiothérapie locale sur des métastases de patients atteints de CBNPC, de stade IV après une première ligne de traitement antitumoral (chimiothérapie ou inhibiteurs de tyrosine kinase anti-REGF). Le CV9202 code pour six antigènes. Elle a consisté en deux injections initiales de vaccin CV9202 réalisées avant la radiothérapie locale sur le site métastatique. Puis cette vaccination a été poursuivie après la fin de la radiothérapie. La tolérance fut bonne et une immunité spécifique a été rapportée chez 84% des patients évalués (vingt et un patients sur les vingt-cinq évaluables). En termes d'efficacité clinique, une réponse partielle a été rapportée chez un patient et douze patients ont eu une maladie stabilisée, ce qui confère des résultats très encourageants pour poursuivre

ce type d'approche thérapeutique. Concernant la toxicité, quatre patients (15,4%) ont présenté des effets indésirables de grade 3. Ces preuves soutiennent une enquête plus approfondie sur le CV9202 en association avec la radiothérapie<sup>(155, 156)</sup>.

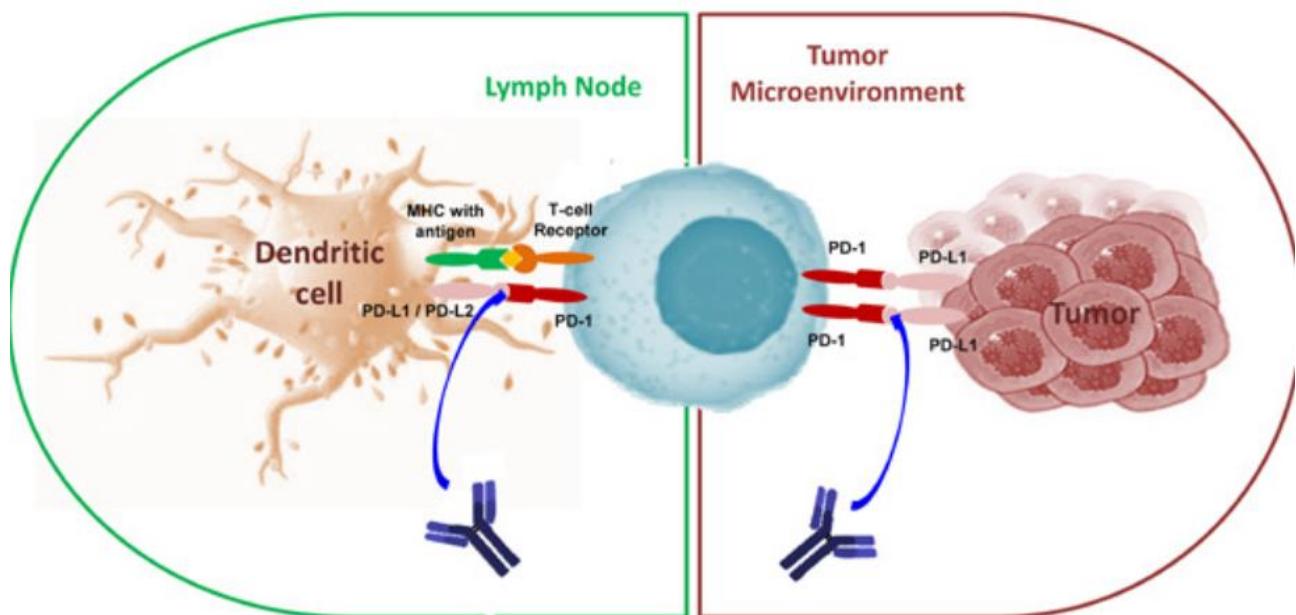
### **3.3.2. Les inhibiteurs de point de contrôle**

D'autres pistes ont aussi été explorées, par exemple la combinaison des vaccins ARNm avec des inhibiteurs de « checkpoints » immunitaires (point de contrôle) ou des modulateurs du micro-environnement. L'inhibition des points de contrôle immunitaires est désormais une stratégie thérapeutique bien établie dans le traitement du cancer. Les points de contrôle immunitaires sont de nombreuses voies d'inhibition dans le système immunitaire. Ils sont essentiels au maintien de la tolérance immunitaire et de l'amplitude des réponses immunitaires physiologiques. Les tumeurs régulent certaines voies de points de contrôle immunitaires en tant que mécanisme majeur de résistance. Étant donné que les points de contrôle sont initiés par des interactions ligand-récepteur, le blocage par les anticorps constitue une approche thérapeutique. Les inhibiteurs de point de contrôle sont principalement des anticorps monoclonaux ; contre les protéines PD-1, PD-L1, CTLA-4. Ils bloquent les signaux inhibiteurs du système immunitaire et renforcent ainsi la réponse immunitaire contre la tumeur<sup>(157)</sup>.

Les anti-CTLA-4 et les anti-PD-1 sont tous deux testés en clinique en tant qu'agents uniques et en immunothérapie combinée. L'objectif de l'immunothérapie anti-CTLA-4 est de bloquer la signalisation négative et de restaurer (ou de renforcer) la fonction du système immunitaire pour détruire les cellules cancéreuses. Le point de contrôle immunologique PD-1 est un récepteur exprimé sur les cellules T activées à la fois dans les ganglions lymphatiques (stade précoce) et dans les tumeurs (stade avancé) du micro-environnement tumoral. Le PD-L1 et PD-L2 sont les ligands de PD-1. Comme pour l'immunothérapie anti-CTLA-4, l'objectif est de bloquer le récepteur PD-1 ou ses ligands afin de réguler la signalisation négative et restaurer la fonction du système immunitaire<sup>(158)</sup>. (Figure 32)



**Anti-CTLA-4 inhibits step 3 (lymph node) of the cancer-immunity cycle as shown in Figure 1**



**Anti-PD-1 inhibits step 3 (lymph node) and step 6 (tumor microenvironment) of the cancer-immunity cycle as shown in Figure 1.**

Figure 32: Exemple d'inhibiteurs de points de control et leurs mécanismes<sup>(158)</sup>

Les laboratoires Moderna et Merck ont présenté récemment les premiers résultats très encourageants de leur combinaison de vaccins ARNm-4157 (34 néo-anticorps élaborés à partir de la signature mutationnelle de l'ADN tumoral du patient) en association avec le pembrolizumab (anti-PD-1) chez des patients atteints de mélanome métastatique. La combinaison de l'ARNm-4157 et du pembrolizumab versus pembrolizumab en monothérapie (essai de phase 2b) a permis de réduire de manière significative la survenue de métastases à distance ou de décès chez 65% des patients atteints de mélanome de stade III/IV inclus dans cet essai. Les laboratoires Moderna et Merck ont décidé de lancer une étude de phase 3 comparant l'ARNm-4157/pembrolizumab au pembrolizumab en monothérapie chez des patients atteints de mélanome malin à haut risque et aussi d'étudier cette combinaison d'immunothérapie pour d'autres types de cancers, comme le CBNPC. Les résultats sont en cours<sup>(155)</sup>. Quant à BioNTech, deux études de phase II ont été menées afin d'évaluer l'efficacité, la tolérance, et l'innocuité des vaccins anticancéreux à base d'ARNm. La première étude concernait des patients atteints d'un mélanome de stade III ou IV réfractaire aux anti-PD-1/en rechute. Le BNT111 en association avec Libtayo ® (cémiplimab ; anti PD-1). Le BNT111 est un vaccin à ARNm-LNP qui partage des combinaisons fixes FixVac (anticorps du cancer) pour incorporer un TAA partagé. BNT111 code pour au moins un des quatre anticorps associés aux mélanoïdes qui présentent une prévalence et une immunogénicité élevées dans le mélanome. Un essai de phase I avec augmentation de dose (NCT02410733) a évalué son efficacité et son innocuité et a suggéré que 39 des 50 patients (75%) ont présenté une réponse immunitaire à un ou plusieurs AAT, au cours de laquelle le BNT111 a pu induire des T CD4+ et T CD8+. Les résultats cliniques sont toujours en attente. Ces résultats encourageants ont donc poussé le laboratoire à réaliser une deuxième étude avec des vaccins à ARNm personnalisé spécifique aux néo anticorps (iNeST), appelée BNT122. Ce vaccin concernait les patients atteints d'un cancer colorectal ayant subi une intervention chirurgicale et une chimiothérapie. L'approche iNeST implique l'utilisation de vaccins complexes ARNm-lipides adaptés pour coder les mutations tumorales individuelles spécifiques. Ce vaccin a été testé dans le cadre d'essais cliniques de phase I sur divers types de cancer, dont le cancer colorectal, soit en monothérapie, soit en association avec l'atezolizumab (anti PD-L1). Le premier régime était bien toléré et induisait une libération de cytokines pro-inflammatoires et une réponse des lymphocytes T chez la plupart des patients. C'est pourquoi BioNTech continue à l'heure actuelle de recruter des patients en vue d'un essai de phase II. Il faut tout de même garder en tête que pour tout

traitement individuel, ce dernier entraîne des coûts plus importants et engendre plus d'inquiétudes en termes de sécurité<sup>(160, 161)</sup>.

Aux vues des premiers résultats, cette combinaison s'avère prometteuse. Cependant, il faut indiquer que cette combinaison est réservée aux patients atteints de cancer à un stade avancé, car le coût d'un vaccin spécifique à chaque cancer est augmenté. De plus, le coût des inhibiteurs de point de contrôle reste non négligeable et s'élève généralement à plusieurs milliers d'euros. De plus, la question de la sécurité reste encore à être évaluée, car il faudra faire attention au risque de réactions auto-immunes et aux effets secondaires.<sup>160</sup> Enfin, la combinaison de vaccins à ARNm et d'inhibiteurs de points de contrôle peut nécessiter une gestion complexe des traitements, incluant des séquences d'administrations précise pour maximiser l'efficacité et minimiser les effets secondaires<sup>(160)</sup>.

### **3.3.3. Les « modulateurs du micro-environnement »<sup>(161, 162)</sup>**

L'utilisation de « modulateur du micro-environnement tumoral » fait aussi partie des stratégies d'amélioration de l'efficacité des vaccins ARNm. Cela est possible grâce à l'utilisation de thérapies ciblées tel que les agents qui modifient les voies de signalisations comme les anti-VEGF (exemple : Sunitinib, inhibiteur de tyrosine kinase). En effet, l'angiogenèse associée aux tumeurs s'est avérée active dans de nombreux cancers solides tels que le cancer du sein et le carcinome hépatocellulaire, les rendant hautement perfusés avec une densité microvasculaire accrue se traduisant par un mauvais pronostic, un faible taux de guérison et des taux de récidive élevés après résection chirurgicale.

Des stratégies majeures ont été développées en ciblant la voie du VEGF, notamment en utilisant des anticorps contre le VEGF et leurs récepteurs, à savoir les VEGFR, ou en inhibant la signalisation intracellulaire de la tyrosine kinase. En effet, la biologie du VEGF sont d'excellentes stratégies déjà utilisées dans le cadre des cancers ainsi que dans les troubles vasculaires intra oculaires. Ces thérapies anti-VEGF améliorent considérablement le taux de survie globale en apportant une réponse à l'angiogenèse pathologique médiée par VEGF. Cependant, la résistance tumorale et la toxicité associées aux médicaments anti angiogéniques actuellement disponibles ont stimulé la nécessité d'une nouvelle stratégie de traitement. Ces inhibiteurs réduisent les effets immunsupresseurs des vaisseaux tumoraux nouvellement formés. On suppose que, la combinaison entre un vaccin ARNm et un anti-VEGF pourrait améliorer « l'infiltration des cellules T » en régulant la formation de néo vaisseaux et en

facilitant l'accès des cellules immunitaires auprès de la tumeur. Les inhibiteurs du VEGF rendent alors les tumeurs plus vulnérables aux attaques immunitaires déclenchées par les vaccins à ARNm<sup>(162)</sup>.

En pratique toutes les études sont encore en cours et les résultats ne sont pas encore publiés. Les vaccins étudiés sont les mêmes que ceux utilisés en association avec les inhibiteurs de points de contrôle. Soit l'ARNm-4157 développé par Moderna, le BNT-122 développé par BioNTech et le CV9202 développé par CureVac. Pour le moment les premiers résultats de ces essais montrent une tolérance acceptable et des signes d'efficacité antitumorale.

### **3.3.4. Autres stratégies d'inhibition<sup>(161,162)</sup>**

D'autres stratégies d'inhibition sont aussi en cours de développement mais ne bénéficient pas encore d'essais cliniques. On peut citer les stratégies visant les cellules immunosuppressives comme les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et les cellules suppressives myéloïdes (MDSC). Les thérapies ciblant les facteurs immuno-suppressifs produits par les cellules tumorales semblent être aussi des cibles potentielles. Par exemple en ciblant la voie TGF-β (Galunisertib (antagoniste du récepteur TGF-β)) ou encore l'utilisation d'inhibiteurs de la voie IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) tel que l'epacadostat. L'IDO est une enzyme qui contribue à l'immunosuppression. En inhibant cette enzyme, l'activité des lymphocytes T peut être restaurée.

Moderna a d'ailleurs récemment élargi son programme de développement de vaccins avec un nouveau vaccin, l'ARNm-4359. Ce vaccin à ARNm agit sur la voie IDO, associé ou non au pembrolizumab et sera administré aux patients atteints de CPNPC et de mélanome cutané avancé ou métastatique. Les résultats sont toujours en cours.

### **3.3.5. Administration de cytokines pro-inflammatoires<sup>(163)</sup>**

Un autre point envisageable est l'administration des interleukines. Ces dernières peuvent stimuler l'activation et la prolifération des cellules immunitaires, qui attaquent directement les cellules tumorales. Certaines interleukines possèdent leurs propres actions comme l'est IL-12 qui possèdent des effets anti-angiogéniques<sup>(163)</sup>. Par conséquent, l'administration d'interleukines pourrait augmenter la réponse immunitaire induite par les vaccins à ARNm. Cette voie doit être utilisée avec précaution, car les interleukines peuvent entraîner des effets secondaires importants (fièvre, fatigue, syndrome grippal). De plus l'administration

concomitante d'ARNm et d'interleukine augmente le risque de réaction inflammatoire sévère (système immunitaire qui s'emballe) et d'effets indésirables auto-immuns non négligeables. Cette stratégie nécessite d'être étudiée de façon plus approfondie afin de déterminer les doses et les interleukines appropriées pour maximiser les bénéfices tout en minimisant les risques. En conclusion, la combinaison des vaccins ARNm en combinaison avec des inhibiteurs du micro-environnement tumoral, représente une avancée prometteuse. Les résultats des essais cliniques qui portent principalement sur l'association avec de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie ainsi que celles avec des inhibiteurs de points de contrôle et des inhibiteurs de l'angiogenèse, pourraient ouvrir la voie à de nouvelles options thérapeutiques pour les patients atteints de cancer avancé.

### **3.4. Quels biomarqueurs pour évaluer la réponse aux traitements<sup>146</sup> ?**

L'introduction nouvelle de vaccin ARNm dans le cancer souligne également la nécessité de nouvelles normes d'évaluation de l'efficacité. Les traitements anticancéreux traditionnels, tels que la chimiothérapie, la thérapie ciblée et la radiothérapie, ciblent directement les cellules tumorales. L'évaluation de la réussite du traitement repose alors sur le rétrécissement de la tumeur, évaluée par imagerie. Or, les vaccins à ARNm stimulent le système immunitaire pour produire une réponse antitumorale. Pour identifier de manière significative quels vaccins contre le cancer à ARNm devraient progresser au-delà des essais de phase précoce et dans des essais cliniques de phase III plus vastes, il faut établir de nouveaux biomarqueurs capables de surveiller avec précision la réponse thérapeutique à ces vaccins. Plusieurs études évaluent l'efficacité des thérapies à base d'ARNm en mesurant la réponse immunitaire, telles que les cytokines, les chimiokines ou les cellules immunitaires présentes dans le sang. Le nombre et l'activité des lymphocytes T CD8+ et T CD4+ dans le sang et les tissus tumoraux sont des indicateurs cruciaux par exemple. Des tests sont alors en développement pour évaluer la réponse immunitaire, comme les tests ELISPOT (enzyme-linked immunospot) qui mesurent la libération de cytokines. D'autres tests comme la cytométrie en flux et la coloration des cytokines intracellulaire peuvent être utilisés. Malgré des recherches poussées pour évaluer la réponse au traitement, les tests développés présentent de forte variabilité inter-laboratoire. Des procédures standardisées et harmonisées, depuis la banque d'échantillons jusqu'à la validation des tests et la communication des résultats, sont donc nécessaires pour un développement clinique réussi.

### **3.5. Etudes en cours : promesse d'une amélioration de la prise en charge des cancers.**

En association avec d'autres traitements, les vaccins ARNm ont un rôle à jouer dans la prise en charge des cancers. Notamment, pour les cancers à un stade avancé. Les études cliniques en cours s'intéressent à divers types de cancer : mélanomes cutanés à haut risque, au cancer colorectal, du pancréas, cancer du poumon non à petites cellules... La plupart des vaccins étudiés sont des vaccins encapsulés, seuls quelques vaccins à ARNm nus ont fait l'objet d'essais cliniques.

#### **3.5.1. Vaccins ARNm « non formulés »<sup>(164,165)</sup>**

Dans un essai clinique de phase 1 des vaccins à ARNm non formulés ont été administrés par voie intra nodale à 13 patients atteints d'un mélanome de stade III ou IV. Ce vaccin codait dix néo épitopes sélectionnés pour chaque patient. Tous les patients ont développé une réponse des lymphocytes T contre de nombreux néo épitopes codés par le vaccin. Des réponses cliniques liées au vaccin ont été observées chez deux des cinq patients atteints d'un mélanome de stade IV. A l'heure actuelle aucun essai clinique enregistré sur ClinicalTrials.gov ne recrute de patient pour un traitement vaccinal contre le cancer à ARNm non formulé.

#### **3.5.2. Vaccins ARNm formulés avec des protamines**

Ensuite viennent les ARNm formulés avec des protamines. Sept patients atteints d'un CPNPC (cancer du poumon non à petites cellules) de stade IIIB et 39 patients atteints d'un CPNPC de stade IV ont reçu cinq injections intradermiques de vaccins ARNm à nucléotides modifiés (codant pour cinq antigènes associés aux tumeurs du CPNPC). Les vaccins ont été bien tolérés et des réponses des lymphocytes T contre au moins un antigène associé à la tumeur ont été détectées chez 19 des 30 patients évaluables, mais le traitement n'a pas amélioré la survie globale par rapport aux témoins.

L'essai clinique 1b a évalué un traitement en association avec une irradiation locale chez des patients atteints d'un CPNPC de stade IV. Dans cet essai, l'ARNm codait pour six antigènes associés à la tumeur et le vaccin a été administré aux patients par voie intradermique. Ce vaccin a été bien toléré et des réponses immunitaires spécifiques à plusieurs antigènes ont été détectées. Des essais supplémentaires sont donc en cours, notamment pour tester ce vaccin en association avec des anti PD-L1, mais les résultats ne sont pas encore publiés. Comme pour

les ARNm nus, à l'heure actuelle il n'y a pas de recrutement de patient pour un traitement vaccinal contre le cancer à ARNm formulé avec des protamines<sup>(164,165)</sup>.

### **3.5.3. Vaccins ARNm formulés à base de particules lipidiques**

Les vaccins ARNm formulés à base de particules lipidiques sont les plus étudiés, car c'est cette forme qui a fait l'objet de nombreuses recherches, notamment durant la période de la Covid. De plus cette forme a permis d'obtenir les meilleurs résultats. (*Tableau III*). S'agissant des lipoplexes, un essai de phase I a évalué l'innocuité et l'efficacité d'un vaccin lipoplexe à ARNm (BNT111) codant pour quatre antigènes chez des patients atteints d'un mélanome avancé. Ce dernier a été formulé avec une combinaison fixe d'antigènes associés à la tumeur ; FixVac. Sur les 50 patients près de 75% ont exprimé des lymphocytes T CD8+ et T CD4 contre un ou plusieurs antigènes associés à la tumeur. Puis le vaccin a été évalué en association avec un anti-PD-1 comparé à la monothérapie. Le vaccin injecté en association s'est montré trois fois plus efficace que le vaccin en monothérapie. Le FixVac a aussi été étudié dans le traitement du cancer de l'ovaire ; le FixVac BNT115 code pour trois antigènes associés au tumeurs spécifiques de l'ovaire. D'autres études sont menées dans le cadre du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, CPNPC avancé ou métastasique...

Des ARNm individualisés encapsulés dans des lipoplexes ont aussi fait l'objet d'études. Par exemple l'ARNm individualisé spécifique aux néoantigènes (iNeST) ou BNT122. Ce vaccin code pour des mutations tumorales individuelles. Il est également évalué en association avec un autre ARNm formulé par lipoplexes codant pour des TAA (BNT114) et un ARN codant pour p53 chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif. Ce cancer présente un phénotype clinique agressif dépourvu d'expression des cibles médicamenteuses conventionnelles. Au terme de cette étude, tous les patients analysés présentaient des réponses des lymphocytes T CD4+ et/ou CD8+ induites par le vaccin contre 1 à 10 des néoépitopes vaccinaux. Ces données préliminaires suggèrent que l'iNeST est très efficace pour induire de fortes réponses de lymphocytes T chez les patients atteints de cancer du sein triple négatif dans le cadre d'un traitement post-(néo) adjuvant<sup>(159, 166)</sup>.

Dans le traitement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) un essai de phase I a été réalisé avec un vaccin ARNm néo-antigène individualisé appelé cévuméran et encapsulé dans des lipoplexes. La synthèse des vaccins néo-antigènes à ARNm a été faite en temps réel

à partir des tumeurs PDAC réséquées chirurgicalement. Après l'intervention chirurgicale, une administration séquentiellement de l'atezolizumab (une immunothérapie anti-PD-L1), de cévuméran autogène (un maximum de 20 néoantigènes par patient) et une version modifiée d'un schéma de chimiothérapie à quatre médicaments (mFOLFIRINOX, comprenant de l'acide folinique, du fluorouracile, de l'irinotécan et oxaliplatine) a été réalisé. Ainsi, l'adjuvant atezolizumab, le cévuméran autogène et le mFOLFIRINOX induisent une activité importante des lymphocytes T qui peut être corrélée à une récidive retardée de la PDAC<sup>(167)</sup>.

En conclusion, la plupart des vaccins anticancéreux à base d'ARNm sont thérapeutiques plutôt que prophylactiques et nécessitent des administrations multiples et une puissance vaccinale suffisante pour induire une réponse tumorale. Les vaccins à base d'ARNm en monothérapie pourraient constituer un traitement efficace pour les patients diagnostiqués avec un cancer à un stade précoce ou dans un contexte adjuvant, mais il semble peu probable que ces vaccins réussissent en tant que traitement en monothérapie pour les cancers avancés en raison des défis liés au micro-environnement tumoral hautement immunosuppresseur. L'amélioration du séquençage, les découvertes sur les cancers et l'identification des néo-antigènes propulsent aussi leur développement. En outre, les défis liés à l'immunogénicité et à l'efficacité des vaccins à ARNm restent à évaluer. De plus, les obstacles technologiques et réglementaires qui découleront de la nécessité d'une production rapide et à grande échelle de bonnes pratiques de fabrication des vaccins individualisés à ARNm constituent de futurs obstacles à surmonter. (Tableau III)

Tableau III : Résumé non exhaustif de résultats publiés des essais de vaccins contre le cancer à ARNm par type de formulation<sup>(164)</sup>.

<b>Formulation</b>	<b>Cible antigène</b>	<b>Type de cancer</b>	<b>Patient(s)</b>	<b>Combinaison</b>	<b>Réponse</b>
Non-formulés	Néo-épitopes individualisés de chaque patients	Mélanome Stade III et IV	13	Aucune	Un patient (8%) a eu une réponse complète et un autre patient (8%) a eu une réponse partielle.
	CD40L, CD70, caTLR4; Antigènes associés à la tumeur : tyrosinase, gp100, MAGE-A3, MAGE-C2, and PRAME	Mélanome réséqué (stades IIc, III et IV)	20	Aucune	Réponses immunitaires induites par le vaccin chez quatre (40%) des dix patients (faible dose) et trois (33%) des neuf patients (dose élevée)
Protamine	PSA, PSMA, PSCA, STEAP1, PAP, and MUC1	Cancer de la prostate métastatique résistant à la castration	197	Non	Aucune différence significative dans la survie.

	MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, survivin, and 5T4	Cancer du poumon non à petites cellules (stades IIIb et IV)	46	Non	Aucune réponse objective ; survie sans progression et survie globale non améliorées
	MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, survivin, 5T4, and MUC-1	Cancer du poumon non à petites cellules (stade IV)	26	Avec irradiation locale (avec ou sans pémétrexed et avec ou sans inhibiteur de la tyrosine-kinase de l'EGFR)	Un patient (4%) a présenté une réponse partielle en association avec un traitement de chimiothérapie, et 12 (46%) patients ont présenté une maladie stable.
Lipoplex	NY-ESO-1, tyrosinase, MAGE-A3, and TPTE	Mélanome	25 (monothérapie) ; 17 (combinaison)	Avec ou sans thérapie PD-1 standard	Vaccin à ARNm avec traitement anti-PD-1 : six (35%) patients ont eu une réponse partielle et deux (12%) avaient une maladie stable ; Monothérapie par vaccin à ARNm : trois (12%) patients ont eu une réponse partielle et sept (28%) ont eu une maladie stable

Nanoparticules lipidiques	Néoantigènes spécifiques	Cancer gastro-intestinale	4	Non	Absence de réponse clinique objective
	Vaccin personnalisé contre le cancer codant pour plusieurs néo antigènes	Tumeurs solides	13 (monothérapie) ; 19 (combinaison)	Avec  Pembrolizumab	Monothérapie : 12 patients n'avaient plus de cancer sous le traitement à l'étude avec un suivi médian de 8 mois ;  Traitement combiné : un patient a eu une réponse complète avant la vaccination, deux patients ont eu une réponse partielle, cinq patients ont eu une maladie stable, cinq ont eu une progression de la maladie et deux ont eu une progression de la maladie non confirmée.

CAR : Récepteur d'antigènes chimériques.

## Conclusion

Ces dernières années ont donné lieu à des avancées cruciales dans le monde des vaccins, avec le développement rapide des premiers vaccins à ARNm contre le SRAS-CoV-2. Les plateformes vaccinales traditionnelles sont présentées comme ayant des limites en termes d'évolutivité, de rapidité de développement et d'adaptabilité aux agents pathogènes émergents. En revanche, les vaccins à ARNm offrent une plateforme polyvalente et rapide pour le développement de vaccins ciblés. Leur nature modulable permet une adaptation facile à différents agents pathogènes, et leurs capacités de production rapide offrent une flexibilité pour répondre à de nombreuses maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes. Cependant, la délivrance efficace des molécules d'ARNm reste un défi, surmonté grâce à l'utilisation de nanoparticules, principalement des LNP et d'autres supports comme les polymères et la protamine. Ces derniers assurent la protection, l'absorption cellulaire efficace et la libération contrôlée de l'ARNm. Sans ces vecteurs, de grandes doses d'ARNm seraient nécessaires, avec une faible pénétration cellulaire.

Au-delà de l'utilisation d'un vecteur approprié, la modification structurelle des ARNm est un élément indispensable. L'optimisation des caractéristiques structurelles de l'ARNm, telles que la coiffe 5', les UTRs 5' et 3', la région codante et la queue poly(A), améliore la stabilité et l'efficacité de l'ARNm. Les modifications de structures bénéficieront des travaux pour améliorer le séquençage et des algorithmes développés par l'intelligence artificielle. Ce travail souligne l'importance d'optimiser les vaccins à ARNm pour les appliquer à d'autres pathologies. Des avancées supplémentaires en matière de puissance et de ciblage tissulaire, grâce à des matériaux d'administration améliorés et l'inclusion d'éléments de ciblage supplémentaires, continueront à ouvrir des portes à de nouvelles applications thérapeutiques.

Les essais cliniques portent surtout sur les pathologies infectieuses et notamment virales. Une conception plus rapide d'un vaccin est envisagée pour le virus de la grippe qui représente une part de marché importante dans nos pays occidentaux. L'ARNm permet de s'affranchir des six mois d'attente pour sélectionner la bonne souche et promet des délais de production raccourcis, offrant ainsi une meilleure rentabilité. Dans le traitement du VIH, les vaccins ARNm font aussi l'objet d'études. Cependant, la production se heurte à des défis de taille, à cause des caractéristiques liées à la famille des rétrovirus et à cause du phénomène d'ADE. Un vaccin

en monothérapie semble alors inefficace pour traiter les patients atteints du VIH. En revanche une association avec des agents d'inversion de latence donne des résultats prometteurs. En plus de travaux conséquents sur les virus, les parasites et les bactéries font également l'objet d'études. En parasitologie, les recherches sont limitées en raison de leur vaste génome et de leur cycle de vie complexe. Seuls des essais sur le paludisme ont été réalisés. En bactériologie les ARNm pourraient donner des clés dans la lutte à l'antibiorésistance.

Par ailleurs, les applications futures des vaccins à ARNm vont au-delà de la prévention des maladies infectieuses. Ils présentent un potentiel considérable dans le traitement des cancers. Bien que, les vaccins contre le cancer n'ont pas fait leurs preuves en monothérapie, des résultats encourageants suggèrent que la combinaison avec d'autres traitements pourrait améliorer la prise en charge des cancers de stade avancés. Ici, l'apport des vaccins ARNm réside dans les nouvelles technologies de fabrication où des vaccins individualisés peuvent être conçus à partir de la tumeur des patients. C'est pourquoi les nombreux travaux s'interrogeant sur la sécurité de ces vaccins doivent être poursuivis. A l'avenir, les recherches vont se concentrer sur l'amélioration de la conception des systèmes d'administration et des processus de fabrication des vaccins. Comprendre la sécurité et la durabilité à long terme des réponses immunitaires générées par les vaccins à ARNm est crucial. De plus, l'exploration de la combinaison des vaccins à ARNm avec d'autres thérapeutiques pourrait améliorer encore leur efficacité. La poursuite de la recherche et de la collaboration dans le domaine des vaccins à ARNm ouvrira la voie à des solutions innovantes pour la prévention et le traitement des pathologies existantes et émergentes.

## Bibliographie

1. Staple DW, Butcher SE. Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions. *PLOS Biology*. 14 juin 2005 ; 3(6) : e213. Disponible sur : <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030213>
2. Fe D. mRNA Structure and Function. Dans : *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press ; 1977. p. 493-511. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60941-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60941-1)
3. Pardi, N., Hogan, M. J., & Weissman, D. (2020). Recent advances in mRNA vaccine technology. *Current Opinion in Immunology*, 65, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.008>
4. Messenger RNA (mRNA). Genome.gov. Disponible sur : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna>
5. Versteeg L, Almutairi MM, Hotez PJ, Pollet J. Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines*. 20 sept 2019 ; 7(4) : 122. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vaccines7040122>
6. Alberts B. The Adaptive Immune System. *Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf*. 2002. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>
7. Wang Y, Zhang Z, Luo J, Han X, Wei Y. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*. 16 févr 2021 ; 20(1). Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01311-z>
8. Ho, W. W., Gao, M., Li, F., Li, Z., Zhang, X., & Xu, X. (2021). Next-Generation vaccines : Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 10(8). <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>
9. Joubert E, Kekeh AC, Amin CN. COVID-19 and novel mRNA vaccines in pregnancy : an updated literature review. *Bjog : An International Journal Of Obstetrics And Gynaecology*. 1 nov 2021 ; 129(1) : 21-8. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16973>
10. Rosa SM, Prazeres DMF, Azevedo A, Marques MPC. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*. 1 avr 2021; 39(16) : 2190-200. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
11. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*.

25 août 2021; 20(11): 817-38. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>

- 12.** Phua, K. K., Leong, K. W., & Nair, S. K. (2013). Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *Journal of Controlled Release*, 166(3), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.029>
- 13.** Zhang H, Rombouts K, Raes L, Xiong R, De Smedt SC, Braeckmans K. Fluorescence-Based Quantification of Messenger RNA and Plasmid DNA Decay Kinetics in Extracellular Biological Fluids and Cell Extracts. *Advanced biosystems*. 23 mars 2020 ; 4(5) : 2000057. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/adbi.202000057>
- 14.** Uchida S, Perche F, Pichon C, Cabral H. Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 26 août 2020 ; 17(10) : 3654-84. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618>
- 15.** Schoenberg DR, Maquat LE. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*. 6 mars 2012 ; 13(4) : 246-59. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- 16.** Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery* 1 mai 2016 ; 7(5) : 319-34. Disponible sur : <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>
- 17.** Pardi N, Hogan M, Porter FS, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12 janv 2018 ; 17(4) : 261-79. Disponible sur: <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- 18.** Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten GFA, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 1 mai 2021 ; 601 : 120586. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
- 19.** Vitiello A, Ferrara F. Brief review of the mRNA vaccines COVID-19. *Inflammopharmacology*. 1 mai 2021 ; 29(3) : 645-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00811-0>
- 20.** Kowalski PM, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger : Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular Therapy*. 1 avr 2019 ; 27(4) : 710-28. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>

- 21.** Sabinis, S., Kumarasinghe, E. S., Salerno, T., Mihai, C. T., Ketova, T., Senn, J. J., Lynn, A., Bulychev, A., Mcfadyen, I., Chan, J. Y., Almarsson, O., Stanton, M. G., & Benenato, K. (2018). A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Molecular Therapy*, 26(6), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.010>
- 22.** Hardianto A, Muscifa ZS, Widayat W, Yusuf M, Subroto T. The effect of ethanol on lipid nanoparticle stabilization from a molecular dynamics simulation perspective. *Molecules*. 17 juin 2023 ; 28(12) : 4836. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/molecules28124836>
- 23.** Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*. 25 févr 2021 ; 20(1). Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>
- 24.** Chen M, Xing D, Liu S. Next-Generation Nonviral Vectors for mRNA Vaccine Delivery. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 24 janv 2022 ; 223(5) : 2100443. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/macp.202100443>
- 25.** Wang C, Zhang Y, Dong Y. Lipid Nanoparticle-mRNA Formulations for Therapeutic Applications. *Accounts of Chemical Research* . 18 nov 2021 ; 54(23) : 4283-93. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00550>
- 26.** Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceutical medicine*. 30 janv 2022 ; 36(1) : 11-20. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s40290-021-00417-5>
- 27.** Eygeris Y, Gupta M, Kim J, Sahay G. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Accounts of Chemical Research*. 1 déc 2021 ; 55(1) : 2-12. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>
- 28.** Benedicto EA, Farbiak L, Ramirez ME, Wang X, Johnson LC, Mian O, et al. Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). *Biomaterials Science*. 1 janv 2022 ; 10(2) : 549-59. Disponible sur : <https://doi.org/10.1039/d1bm01454d>
- 29.** Swetha K, Kotla NG, Tunki L, Jayaraj A, Bhargava SK, Hu H, et al. Recent advances in the lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA vaccines. *Vaccines*. 14 mars 2023 ; 11(3) : 658. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vaccines11030658>

- 30.** Zhou L, Zhu YH, Wang X, Shen C, Wei X, Xu T, et al. Novel Zwitterionic vectors: multi-functional delivery systems for therapeutic genes and drugs. Computational and structural biotechnology journal. 1 janv 2020 ; 18 : 1980-99. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.07.015>
- 31.** Higuchi, A., Sung, T., Wang, T., Ling, Q., Kumar, S. S., Hsu, S., & Umezawa, A. (2022). Material design for Next-Generation mRNA vaccines using lipid nanoparticles. *Polymer Reviews*, 63(2), 394-436. <https://doi.org/10.1080/15583724.2022.2106490>
- 32.** Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. H., & MacLachlan, I. (2005). Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107(2), 276-287. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.014>
- 33.** Díaz-Arévalo, D., & Zeng, M. (2020). Nanoparticle-based vaccines. Dans Elsevier eBooks (p. 135-150). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817778-5.00007-5>
- 34.** Hassett KJ, Higgins JS, Woods A, Levy BR, Xia Y, Hsiao CJ, et al. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. *Journal of Controlled Release*. 1 juill 2021 ; 335 : 237-46. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.021>
- 35.** Di J, Du Z, Wu K, Jin S, Wang X, Li T, et al. Biodistribution and non-linear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size. *Pharmaceutical Research*. 1 janv 2022 ; 39(1) : 105-14. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>
- 36.** Ita KB. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery : progress and bottlenecks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1 juill 2020 ; 150 : 105358. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105358>
- 37.** Yin Y, Li X, Ma H, Zhang J, Yu D, Zhao R, et al. In situ Transforming RNA nanovaccines from polyethylenimine functionalized graphene oxide hydrogel for durable cancer immunotherapy. *Nano Letters*. 17 févr 2021 ; 21(5) : 2224-31. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c05039>
- 38.** Yang W, Mixich L, Boonstra E, Cabral H. Polymer-Based mRNA delivery strategies for advanced therapies. *Advanced Healthcare Materials*. 27 févr 2023 ; 12(15). Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/adhm.202202688>

- 39.** Chen G, Zhao B, Ruiz ER, Zhang F. Advances in the polymeric delivery of nucleic acid vaccines. *Theranostics*. 1 janv 2022 ; 12(9) : 4081-109. Disponible sur : <https://doi.org/10.7150/thno.70853>
- 40.** Roufaï MB, Midoux P. Histidylated polylysine as DNA vector : elevation of the imidazole protonation and reduced cellular uptake without change in the polyfection efficiency of serum stabilized negative polyplexes. *Bioconjugate Chemistry*. 21 déc 2000 ; 12(1) : 92-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/bc0000738>
- 41.** Wang Y, Qin B, Xia G, Choi S. FDA's PoLY (Lactic-Co-Glycolic Acid) research program and regulatory outcomes. *Aaps Journal*. 29 juin 2021 ; 23(4). Disponible sur : <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00611-y>
- 42.** Karlsson J, Rhodes K, Green JJ, Tzeng SY. Poly(beta-amino ester)s as gene Delivery vehicles : Challenges and opportunities. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 31 juill 2020 ; 17(10) : 1395-410. Disponible sur : <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1796628>
- 43.** Keeney M, Ong SG, Padilla A, Yao Z, Goodman SB, Wu JC, et al. Development of poly(B-amino ester)-Based biodegradable nanoparticles for nonviral delivery of minicircle DNA. *ACS Nano*. 16 juill 2013 ; 7(8) : 7241-50. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/nn402657d>
- 44.** Green JJ, Langer R, Anderson DG. A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery. *Accounts of Chemical Research*. 29 mai 2008 ; 41(6) : 749-59. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/ar7002336>
- 45.** Meng C, Chen Z, Li G, Welte T, Shen H. Nanoplatforms for mRNA therapeutics. *Advanced therapeutics*. 21 juill 2020 ; 4(1) : 2000099. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/adtp.202000099>
- 46.** Jarzebska N, Mellett M, Frei J, Kündig TM. Protamine-Based strategies for RNA transfection. *Pharmaceutics*. 14 juin 2021 ; 13(6) : 877. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060877>
- 47.** Sharifnia Z, Bandehpour M, Hamishehkar H, Mosaffa N, Kazemi B, Zarghami N. In-vitro transcribed mRNA delivery using PLGA/PEI nanoparticles into human monocyte-derived dendritic cells. *PubMed*. 1 janv 2019 ; 18(4) : 1659-75. Disponible sur : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32184837>

- 48.** Ahsan A, Tian WX, Farooq MA, Khan DH. An overview of hydrogels and their role in transdermal drug delivery. International Journal of Polymeric Materials. 19 mars 2020 ; 70(8) : 574-84. Disponible sur : <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1740989>
- 49.** Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Hydrogels as drug delivery systems ; Pros and cons. Trends in Pharmaceutical Sciences. 1 mars 2019 ; 5(1) : 7-24. Disponible sur : [https://tips.sums.ac.ir/article\\_44931\\_c496389d981845155e9289cc5a678987.pdf](https://tips.sums.ac.ir/article_44931_c496389d981845155e9289cc5a678987.pdf)
- 50.** Chyi LC, Yi CL, Kumar PV. Dendrimer-based nanocomposites for the production of RNA delivery systems. OpenNano. 1 juill 2023 ; 100173. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100173>
- 51.** Nguyen DN, Green JJ, Chan JM, Langer R, Anderson DG. Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination. Advanced Materials. 23 févr 2009 ; 21(8) : 847-67. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/adma.200801478>
- 52.** Zhang D, Atochina-Vasserman EN, Maurya DS, Huang N, Xiao Q, Ona N, et al. One-Component multifunctional Sequence-Defined ionizable amphiphilic janus dendrimer delivery systems for mRNA. Journal of the American Chemical Society. 29 juill 2021 ; 143(31) : 12315-27. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/jacs.1c05813>
- 53.** Kisakova LA, Apartsin E, Низоленко ЛФ, Karpenko LI. Dendrimer-Mediated delivery of DNA and RNA vaccines. Pharmaceutics. 30 mars 2023 ; 15(4) : 1106. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041106>
- 54.** Li M, Zhao M, Fu Y, Li Y, Gong T, Zhang Z, et al. Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. Journal of Controlled Release. 1 avr 2016 ; 228 : 9-19. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.043>
- 55.** Yang, X., Wei, Y., Liu, Z., You, J., Li, H., Gao, L., Gong, C., & Yi, C. (2022). Polyethyleneimine-based immunoadjuvants for designing cancer vaccines. Journal of Materials Chemistry B, 10(40), 8166-8180. <https://doi.org/10.1039/d2tb01358d>
- 56.** Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, Kauffman KJ, Mir F, Heartlein MW, et al. Inhaled nanoformulated mRNA polyplexes for protein production in lung epithelium. Advanced Materials [Internet]. 4 janv 2019 ; 31(8) : 1805116. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/adma.201805116>
- 57.** Buschmann MD, Carrasco M, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. Nanomaterial delivery systems for mRNA vaccines. Vaccines. 19 janv 2021; 9(1) : 65. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>

- 58.** Ren J, Cao Y, Li L, Wang X, Lu H, Yang J, et al. Self-assembled polymeric micelle as a novel mRNA delivery carrier. *Journal of Controlled Release*. 1 oct 2021; 338: 537-47. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.061>
- 59.** Engineering nanoparticle toolkits for mRNA delivery. *ScienceDirect*. 2 août 2023 ; Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.115042>
- 60.** De Beuckelaer A, Pollard C, Van Lint S, Roose K, Van Hoecke L, Naessens T, et al. Type I interferons interfere with the capacity of mRNA lipoplex vaccines to elicit cytolytic T cell responses. *Molecular Therapy*. 1 nov 2016; 24(11): 2012-20. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/mt.2016.161>
- 61.** Persano S, Guevara ML, Li Z, Mai J, Ferrari M, Pompa PP, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials*. 1 mai 2017 ; 125 : 81-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.019>
- 62.** Karmacharya P, Patil BR, Kim JO. Recent advancements in lipid-mRNA nanoparticles as a treatment option for cancer immunotherapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 26 mars 2022 ; 52(4) : 415-26. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s40005-022-00569-9>
- 63.** Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, Malaekeh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 1 août 2016 ; 236 : 1-14. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.023>
- 64.** Jerzykiewicz J, Czogalla A. Polyethyleneimine-Based lipopolyplexes as carriers in anticancer gene therapies. *Materials*. 27 déc 2021 ; 15(1) : 179. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ma15010179>
- 65.** Sanmartín I, Sendra L, Moret I, Aliño SF. Multicompartimental lipopolyplex as vehicle for antigens and genes delivery in vaccine formulations. *Pharmaceutics*. 19 févr 2021 ; 13(2) : 281. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020281>
- 66.** Tan Y, Lu S, Wang B, Duan X, Zhang Y, Peng X, et al. Single-cell transcriptome Atlas reveals protective characteristics of COVID-19 mRNA vaccine. *Journal of Medical Virology*. 1 oct 2022 ; 95(1). Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/jmv.2816>
- 67.** H Guevara ML, Jilesen Z, Stojdl DF, Persano S. Codelivery of mRNA with A-Galactosylceramide using a new lipopolyplex formulation induces a strong antitumor response upon intravenous administration. *ACS omega*. 7 août 2019 ; 4(8) : 13015-26. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00489>

- 68.** Alfagih IM, Aldosari B, AlQuadeib BT, Almurshedi AS, Alfagih MM. Nanoparticles as adjuvants and nanodelivery systems for mRNA-Based vaccines. *Pharmaceutics*. 30 déc 2020 ; 13(1) : 45. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010045>
- 69.** Dow, S. (2007). Liposome–nucleic acid immunotherapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(1), 11-24. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.1.11>
- 70.** Jackson NAC, Kester KE, Casimiro DR, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines : A biotech and industrial perspective. *npj vaccines*. 4 févr 2020 ; 5(1). Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>
- 71.** Dilliard SA, Cheng Q, Siegwart DJ. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21 déc 2021 ; 118(52). Disponible sur : <https://doi.org/10.1073/pnas.2109256118>
- 72.** Francia V, Schiffelers RM, Cullis PR, Witzigmann D. The biomolecular corona of lipid nanoparticles for gene therapy. *Bioconjugate Chemistry*. 7 août 2020 ; 31(9) : 2046-59. Disponible sur : <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00366>
- 73.** Kularatne RN, Crist RM, Stern ST. The future of Tissue-Targeted Lipid Nanoparticle-Mediated Nucleic Acid delivery. *Pharmaceutics*. 20 juill 2022 ; 15(7) : 897. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/ph15070897>
- 74.** Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*. 4 janv 2022 ; 23(5) : 265-80. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- 75.** Aldosari BN, Alfagih IM, Almurshedi AS. Lipid nanoparticles as delivery systems for RNA-Based vaccines. *Pharmaceutics [Internet]*. 2 févr 2021 ; 13(2) : 206. Disponible sur : <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/2/206>
- 76.** Chehelgerdi, M., & Chehelgerdi, M. (2023). The use of RNA-based treatments in the field of cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01807-w>
- 77.** Kim, S. C., Sekhon, S. S., Shin, W., Ahn, G., Cho, B., Ahn, J., & Kim, Y. (2021b). Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Molecular & Cellular Toxicology*, 18(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00171-4>

- 78.** Xu, S., Yang, K., Li, R., & Zhang, L. (2020b). mRNA Vaccine Era—Mechanisms, drug platform and Clinical Prospection. International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 6582. <https://doi.org/10.3390/ijms21186582>
- 79.** Henderson, J. M., Myers, E., Hou, A., Ujita, A., Trinh, T., Schubert, R., & Houston, M. In vivo expression of exogenous mRNA synthesized with co-transcriptional capping. [https://www.trilinkbiotech.com/media/folio3/productattachments/coa/TechNote\\_CleanCap\\_20230221.pdf](https://www.trilinkbiotech.com/media/folio3/productattachments/coa/TechNote_CleanCap_20230221.pdf)
- 80.** Henderson, J. M., Ujita, A., Hill, E. M., Yousif-Rosales, S., Smith, C., Ko, N., McReynolds, T., Cabral, C. R., Escamilla-Powers, J. R., & Houston, M. E. (2021). Cap 1 Messenger RNA synthesis with co-transcriptional CleanCap® analog by in vitro transcription. Current protocols, 1(2). <https://doi.org/10.1002/cpz1.39>
- 81.** Tusup, M., French, L. E., De Matos, M., Gatfield, D., Kündig, T. M., & Pascolo, S. (2019). Design of in vitro transcribed mRNA vectors for research and therapy. Chimia, 73(5), 391. <https://doi.org/10.2533/chimia.2019.391>
- 82.** Kang, D. D., Li, H., & Dong, Y. (2023). Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics. Advanced Drug Delivery Reviews, 199, 114961. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114961>
- 83.** Kon, E., Elia, U., & Peer, D. (2022). Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. Current Opinion in Biotechnology, 73, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.016>
- 84.** Castillo-Hair, S. M., & Seelig, G. (2021). Machine learning for designing Next-Generation mRNA therapeutics. Accounts of Chemical Research, 55(1), 24-34. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00621>
- 85.** Mauger, D. M., Cabral, B. J., Presnyak, V., Su, S. V., Reid, D. W., Goodman, B., Link, K., Khatwani, N., Reynders, J., Moore, M. J., & McFadyen, I. J. (2019). mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(48), 24075-24083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908052116>
- 86.** Linares-Fernández, S., Lacroix, C., Exposito, J., & Verrier, B. (2020). Tailoring mRNA vaccine to balance Innate/Adaptive Immune Response. Trends in Molecular Medicine, 26(3), 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.002>

- 87.** Litvinova, V. R., Рудометов, А. П., Karpenko, L. I., & Ilyichev, A. A. (2023). mRNA Vaccine Platform : mRNA production and delivery. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 49(2), 220-235. <https://doi.org/10.1134/s1068162023020152>
- 88.** Kim, Y., Mousavi, K., Yazdi, A. K., Zwierzyna, M., Cardinali, M., Fox, D. M., Peel, T., Coller, J., Aggarwal, K., & Maruggi, G. (2023). Computational design of mRNA vaccines. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.07.024>
- 89.** Liu, T., Liang, Y., & Huang, L. (2021). Development and delivery systems of mRNA vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.718753>
- 90.** Warmiński, M., Mamot, A., Depaix, A., Kowalska, J., & Jemielity, J. (2023). Chemical modifications of mRNA ends for therapeutic applications. *Accounts of Chemical Research*, 56(20), 2814-2826. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00442>
- 91.** Jeeva, S., Kim, K. H., Shin, C. H., Wang, B. Z., & Kang, S. M. (2021). An Update on mRNA-Based Viral Vaccines. *Vaccines*, 9(9), 965. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090965>
- 92.** Erasmus, J. H., Khandhar, A. P., O'Connor, M. A., Walls, A. C., Hemann, E. A., Murapa, P., Archer, J., Leventhal, S., Fuller, J. T., Lewis, T. B., Draves, K. E., Randall, S., Guerriero, K. A., Duthie, M. S., Carter, D., Reed, S. G., Hawman, D. W., Feldmann, H., Gale, M., . . . Fuller, D. H. (2020). An alphavirus -derived replicon RNA vaccine induces SARS-CoV-2 neutralizing antibody and T cell responses in mice and nonhuman primates. *Science Translational Medicine*, 12(555). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc9396>
- 93.** Vogel, A. B., Lambert, L., Kinnear, E., Busse, D., Erbar, S., Reuter, K. C., ... & Tregoning, J. S. (2018). Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Molecular Therapy*, 26(2), 446-455.
- 94.** Minnaert, A., Vanluchene, H., Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., Raemdonck, K., & Sanders, N. N. (2021). Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics : Getting the message across. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113900. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113900>

- 95.** Schmidt, C., & Schnierle, B. S. (2023). Self-Amplifying RNA Vaccine Candidates: Alternative Platforms for mRNA Vaccine Development. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 12(1), 138. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010138>
- 96.** Nitika, Wei, J., & Hui, A. (2022). The delivery of mRNA vaccines for therapeutics. *Life*, 12(8), 1254. <https://doi.org/10.3390/life12081254>
- 97.** Wu, Z., & Li, T. (2021). Nanoparticle-Mediated Cytoplasmic Delivery of Messenger RNA Vaccines : challenges and future Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 38(3), 473-478. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03015-x>
- 98.** Coffey, J. W., Gaiha, G. D., & Traverso, G. (2021). Oral Biologic Delivery: Advances Toward Oral Subunit, DNA, and mRNA Vaccines and the Potential for Mass Vaccination During Pandemics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 61, 517–540. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030320-092348>
- 99.** Roh, E. H., Fromen, C. A., & Sullivan, M. O. (2022). Inhalable mRNA vaccines for respiratory diseases : a roadmap. *Current Opinion in Biotechnology*, 74, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.017>
- 100.** Wu, S., Huang, J., Zhang, Z., Wu, J., Zhang, J., Hu, H., Zhu, T., Zhang, J., Luo, L., Fan, P., Wang, B., Chen, C., Chen, Y., Song, X., Wang, Y., Si, W., Sun, T., Wang, X., Hou, L., & Chen, W. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (AD5-NCOV) in adults : Preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(12), 1654-1664. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00396-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00396-0)
- 101.** De Peña, A. C., Li, N., Vaduva, M., Bwanali, L., & Tripathi, A. (2023). A microfluidic electrophoretic dual dynamic staining method for the identification and relative quantitation of DSRNA contaminants in mRNA vaccines. *Analyst*, 148(16), 3758-3767. <https://doi.org/10.1039/d3an00281k>
- 102.** Raffaele, J., Loughney, J. W., & Rustandi, R. R. (2021). Development of a microchip capillary electrophoresis method for determination of the purity and integrity of mRNA in lipid nanoparticle vaccines. *Electrophoresis*, 43(9-10), 1101-1106. <https://doi.org/10.1002/elps.202100272>
- 103.** Cenikli, D. (2022). A Comparison of Production, Efficacy, and Safety of mRNA and Conventional Vaccines. *International Journal of High School Research*, 4(4).

- 104.** Kim, M. S., Jung, S. Y., Ahn, J. G., Park, S. J., Shoenfeld, Y., Kronbichler, A., Koyanagi, A., Dragioti, E., Tizaoui, K., Hong, S. H., Jacob, L., Salem, J. E., Yon, D. K., Lee, S. W., Ogino, S., Kim, H., Kim, J. H., Excler, J. L., Marks, F., Clemens, J. D., ... Smith, L. (2022). Comparative safety of mRNA COVID-19 vaccines to influenza vaccines: A pharmacovigilance analysis using WHO international database. *Journal of medical virology*, 94(3), 1085–1095. <https://doi.org/10.1002/jmv.27424>
- 105.** Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Bin, Z., Wu, X., Liu, J., Zhao, D., & Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- 106.** Kiaie, S. H., Majidi Zolbanin, N., Ahmadi, A., Bagherifar, R., Valizadeh, H., Kashanchi, F., & Jafari, R. (2022). Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: immunological and pharmacological aspects. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 276.
- 107.** Maruggi, G., Zhang, C., Li, J., Ulmer, J. B., & Yu, D. (2019). mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Molecular Therapy*, 27(4), 757-772.
- 108.** Deviatkin, A. A., Simonov, R. A., Трутнева, К. А., Maznina, A. A., Khavina, E., & Volchkov, P. (2022). Universal Flu mRNA vaccine : promises, prospects, and problems. *Vaccines*, 10(5), 709. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050709>
- 109.** Erbelding, E. J., Post, D. J., Stemmy, E. J., Roberts, P. C., Augustine, A. D., Ferguson, S. E., Paules, C. I., Graham, B. S., & Fauci, A. S. (2018). A universal influenza vaccine : The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(3), 347-354. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy103>
- 110.** Kackos, C., DeBeauchamp, J., Davitt, C. J. H., Lonzarić, J., Sealy, R. E., Hurwitz, J. L., Samsa, M. M., & Webby, R. J. (2023). Seasonal quadrivalent mRNA vaccine prevents and mitigates influenza infection. *npj Vaccines*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00752-5>
- 111.** Chivukula, S., Plitnik, T., Tibbitts, T., Karve, S., Dias, A., Zhang, D., Goldman, R., Gopani, H., Khanmohammed, A., Sarode, A., Cooper, D. L., Yoon, H., Kim, Y., Yan, Y., Mundle, S. T., Groppo, R., Beauvais, A., Zhang, J., Anosova, N. G., . . . Casimiro, D. R. (2021). Development of multivalent mRNA vaccine candidates for seasonal or pandemic influenza. *npj Vaccines*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00420-6>

- 112.** Brazzoli, M., Magini, D., Bonci, A., Buccato, S., Giovani, C., Kratzer, R., ... & Bertholet, S. (2016). Induction of broad-based immunity and protective efficacy by self-amplifying mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin. *Journal of virology*, 90(1), 332-344.
- 113.** Chopra, H., Choudhary, O. P., & Haleem Abusalah, M. A. (2023). What about a universal mRNA vaccine against influenza?. *QJM: An International Journal of Medicine*, 116(7), 479-482.
- 114.** Van Heuvel, Y., Schatz, S., Rosengarten, J. F., & Stitz, J. (2022). Infectious RNA: human immunodeficiency virus (HIV) biology, therapeutic intervention, and the quest for a vaccine. *Toxins*, 14(2), 138.
- 115.** Khalid, K., Padda, J., Khedr, A., Ismail, D., Zubair, U., Al-Ewaidat, O. A., Padda, S., Cooper, A. C., & Jean-Charles, G. (2021). HIV and Messenger RNA (mRNA) Vaccine. *Cureus*, 13(7), e16197. <https://doi-org.buadistant.univangers.fr/10.7759/cureus.16197>
- 116.** Robinson, H. L. (2018). HIV/AIDS vaccines : 2018. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 104(6), 1062-1073. <https://doi.org/10.1002/cpt.1208>
- 117.** Deeks, S. G., Archin, N. M., Cannon, P. M., Collins, S., Jones, R. B., De Jong, M. A. W. P., Lambotte, O., Lamplough, R., Ndung'u, T., Sugarman, J., Tiemessen, C. T., Vandekerckhove, L., Lewin, S. R., Deeks, S. G., Lewin, S. R., De Jong, M., Ndhlovu, Z. M., Chomont, N., Brumme, Z. L., . . . Kankaka, E. N. (2021). Research priorities for an HIV cure : International AIDS Society Global Scientific Strategy 2021. *Nature Medicine*, 27(12), 2085-2098. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01590-5>
- 118.** Bloom, K., van den Berg, F., & Arbuthnot, P. (2021). Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene therapy*, 28(3-4), 117-129. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y>
- 119.** Mu, Z., Haynes, B. F., & Cain, D. W. (2021). HIV mRNA vaccines—progress and future paths. *Vaccines*, 9(2), 134.
- 120.** Leal, L., Ac, G., Morón-López, S., Salgado, M., Mothe, B., Heirman, C., Pannus, P., Vanham, G., Van Den Ham, H., Gruters, R. A., Andeweg, A. C., S, V. M., Pich, J., Ja, A., Gatell, J., Berthou, C., Thielemans, K., Martínez-Picado, J., Plana, M., & García, F. (2018). Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *AIDS*, 32(17), 2533-2545. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000002026>

- 121.** Rouf, N. Z., Biswas, S., Tarannum, N., Oishee, L. M., & Muna, M. M. (2022). Demystifying mRNA vaccines : an emerging platform at the forefront of cryptic diseases. *RNA Biology*, 19(1), 386-410. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2055923>
- 122.** Mennechet, F. J., & Siatka, C. (2021). La révolution des vaccins à ARN contre les maladies infectieuses. *Salles Propres*.
- 123.** Esteban, I., Pastor-Quiñones, C., Usero, L., Plana, M., García, F., & Leal, L. (2021). In the Era of mRNA Vaccines, Is There Any Hope for HIV Functional Cure ? *Viruses*, 13(3), 501. <https://doi.org/10.3390/v13030501>
- 124.** Van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 12(1), 2814–2838. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
- 125.** Wollner, C. J., Richner, M., Hassert, M. A., Pinto, A. K., Brien, J. D., & Richner, J. M. (2021). A Dengue Virus Serotype 1 mRNA-LNP Vaccine Elicits Protective Immune Responses. *Journal of virology*, 95(12), e02482-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02482-20>
- 126.** Le, T., Sun, C., Chang, J., Zhang, G., & Yin, X. (2022). mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases. *Viruses*, 14(2), 401. <https://doi.org/10.3390/v14020401>
- 127.** Op De Beeck, A., Molenkamp, R., Caron, M., Ben Younes, A., Bredenbeek, P., & Dubuisson, J. (2003). Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. *Journal of virology*, 77(2), 813–820. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.813-820.2003>
- 128.** Bloom, K., van den Berg, F., & Arbuthnot, P. (2021). Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene therapy*, 28(3-4), 117–129. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y>
- 129.** Essink, B., Chu, L., Seger, W., Barranco, E., Le Cam, N., Bennett, H., Faughnan, V., Pajon, R., Paila, Y. D., Bollman, B., Wang, S., Dooley, J., Kalidindi, S., & Leav, B. (2023). The safety and immunogenicity of two Zika virus mRNA vaccine candidates in healthy flavivirus baseline seropositive and seronegative adults: the results of two randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 1 clinical trials. *The Lancet. Infectious diseases*, 23(5), 621–633. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00764-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00764-2)

- 130.** World Health Organization: WHO & World Health Organization: WHO. (2023, December 4). Paludisme. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- 131.** Delaigue, S., Signolet, I., Consigny, P., De Gentile, L., D'Ortenzio, É., Gautret, P., Sorge, F., Strady, C., & Bouchaud, O. (2020). New guidelines for the prevention of imported malaria in France. *Médecine Et Maladies Infectieuses*, 50(2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.07.004>
- 132.** World Health Organization. (2015). Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization.
- 133.** Syed, Y. Y. (2022). RTS, S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. *Drugs & Therapy Perspectives*, 38(9), 373-381.
- 134.** Tsoumani, M. E., Voyatzaki, C., & Efstathiou, A. (2023). Malaria Vaccines: From the Past towards the mRNA Vaccine Era. *Vaccines*, 11(9), 1452. <https://doi.org/10.3390/vaccines11091452>
- 135.** Gomes, P. S., Bhardwaj, J., Rivera-Correa, J., Freire-De-Lima, C. G., & Morrot, A. (2016). Immune escape strategies of malaria parasites. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01617>
- 136.** Hayashi, C.T.H., Cao, Y., Clark, L.C. et al. mRNA-LNP expressing PfCSP and Pfs25 vaccine candidates targeting infection and transmission of Plasmodium falciparum. *npj Vaccines* 7, 155 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00577-8>
- 137.** Rosini, R., Nicchi, S., Pizza, M., & Rappuoli, R. (2020). Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in immunology*, 11, 1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01048>
- 138.** Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.
- 139.** Waseem, M., Naveed, M., Rehman, S. U., Makhdoom, S. I., Aziz, T., Alharbi, M., Alsahammar, A., & Alasmari, A. F. (2023). Molecular Characterization of spa, hld, fmhA, and lukD Genes and Computational Modeling the Multidrug Resistance of Staphylococcus Species through Callindra harrisii Silver Nanoparticles. *ACS omega*, 8(23), 20920–20936. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01597>
- 140.** Naveed, M., Waseem, M., Aziz, T., Hassan, J. U., Makhdoom, S. I., Ali, U., ... & Alsahammar, A. (2023). Identification of bacterial strains and development of

anmRNA-based vaccine to combat antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* via in vitro and in silico approaches. *Biomedicines*, 11(4), 1039.

- 141.** Chand, U., Priyambada, P., & Kushawaha, P. K. (2023). *Staphylococcus aureus* vaccine strategy: promise and challenges. *Microbiological Research*, 127362.
- 142.** Li, Y., Wang, M., Peng, X., Yang, Y., Chen, Q., Liu, J., She, Q., Tan, J., Lou, C., Liao, Z., & Li, X. (2023). mRNA vaccine in cancer therapy: Current advance and future outlook. *Clinical and translational medicine*, 13(8), e1384. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1384>
- 143.** May, M. (2021). After COVID-19 successes, researchers push to develop mRNA vaccines for other diseases. *Nat. Med*, 27(6), 930-932.
- 144.** Sadeghi Rad, H., Monkman, J., Warkiani, M. E., Ladwa, R., O'Byrne, K., Rezaei, N., & Kulasinghe, A. (2021). Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. *Medicinal research reviews*, 41(3), 1474-1498
- 145.** Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 221, 107753.
- 146.** Wang, B., Pei, J., Xu, S., Liu, J., & Yu, J. (2023). Recent advances in mRNA cancer vaccines: meeting challenges and embracing opportunities. *Frontiers in Immunology*, 14, 1246682.
- 147.** Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925.
- 148.** Shim, K., Jo, H., & Jeoung, D. (2023). Cancer/Testis Antigens as Targets for RNA-Based Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14679.
- 149.** Persano, S., Guevara, M. L., Li, Z., Mai, J., Ferrari, M., Pompa, P. P., & Shen, H. (2017). Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials*, 125, 81-89.
- 150.** Esprit, A., de Mey, W., Bahadur Shahi, R., Thielemans, K., Franceschini, L., & Breckpot, K. (2020). Neo-antigen mRNA vaccines. *Vaccines*, 8(4), 776.
- 151.** Huang, X., Zhang, G., Tang, T. Y., Gao, X., & Liang, T. B. (2022). Personalized pancreatic cancer therapy: from the perspective of mRNA vaccine. *Military Medical Research*, 9(1), 53.

- 152.** Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;84:879–880. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.06.020.
- 153.** Demaria S, Golden EB, Formenti SC. Role of local radiation therapy in cancer immunotherapy. *JAMA Oncol.* 2015;1:1325–1332. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2756.
- 154.** Paijens, S. (2021). Tumor immunology & the application of immunotherapy in ovarian carcinoma. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.182133606>
- 155.** SPANO, J. P. (2023). Les perspectives de l'ARN messager en oncologie. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(629), S19-S21.
- 156.** Zhang, S. W., Wang, H., Ding, X. H., Xiao, Y. L., Shao, Z. M., You, C., ... & Jiang, Y. Z. (2023). Bidirectional crosstalk between therapeutic cancer vaccines and the tumor microenvironment: Beyond tumor antigens. *Fundamental Research*, 3(6), 1005-1024.
- 157.** Klein, C. R., & Feldmann, G. (2024). Immuncheckpoint-Inhibition. *Angewandte Nuklearmedizin*, 47(01), 36-50.
- 158.** Lee, L., Gupta, M., & Sahasranaman, S. (2016). Immune Checkpoint inhibitors: An introduction to the next-generation cancer immunotherapy. *The journal of clinical pharmacology*, 56(2), 157-169.
- 159.** Liu, Y., Yan, Q., Zeng, Z., Fan, C., & Xiong, W. (2024). Advances and prospects of mRNA vaccines in cancer immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 189068.
- 160.** Lalli, E. (2024). Immune checkpoint molecules in adrenocortical carcinoma: hope for immunotherapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, dgae311.
- 161.** Wang, T., Tang, Y., Tao, Y., Zhou, H., & Ding, D. (2024). Nucleic acid drug and delivery techniques for disease therapy: Present situation and future prospect. *Interdisciplinary Medicine*, 2(1), e20230041.
- 162.** Khafaga, A. F., Gaballa, M. M., Karam, R., Shoulah, S. A., Shamma, R. N., Khalifa, N. E., ... & Noreldin, A. E. (2024). Synergistic therapeutic strategies and engineered nanoparticles for anti-vascular endothelial growth factor therapy in cancer. *Life Sciences*, 122499.
- 163.** May, M. (2021). After COVID-19 successes, researchers push to develop mRNA vaccines for other diseases. *Nat. Med.*, 27(6), 930-932.

- 164.** Lorentzen, C. L., Haanen, J. B., Met, Ö., & Svane, I. M. (2022). Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment. *The Lancet. Oncology*, 23(10), e450–e458. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00372-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00372-2)
- 165.** Papachristofilou, A., Hipp, M. M., Klinkhardt, U., Früh, M., Sebastian, M., Weiss, C., Pless, M., Cathomas, R., Hilbe, W., Pall, G., Wehler, T., Alt, J., Bischoff, H., Geißler, M., Griesinger, F., Kallen, K. J., Fotin-Mleczek, M., Schröder, A., Scheel, B., Muth, A., ... Zippelius, A. (2019). Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0520-5>
- 166.** Schmidt, M., Vogler, I., Derhovanessian, E., Omokoko, T., Godehardt, E., Attig, S., ... & Sahin, U. (2020). 88MO T-cell responses induced by an individualized neoantigen specific immune therapy in post (neo) adjuvant patients with triple negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 31, S276.
- 167.** Rojas, L. A., Sethna, Z., Soares, K. C., Olcese, C., Pang, N., Patterson, E., Lihm, J., Ceglia, N., Guasp, P., Chu, A., Yu, R., Chandra, A. K., Waters, T., Ruan, J., Amisaki, M., Zebboudj, A., Odgerel, Z., Payne, G., Derhovanessian, E., Müller, F., ... Balacha Indran, V. P. (2023). Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*, 618(7963), 144–150. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06063-y>

# ABSTRACT

# RÉSUMÉ

## SANDADI Marine

### ARNm : Nouveau candidat médicament pour la prise en charge de diverses pathologies.

Le développement rapide des vaccins à ARNm contre la COVID-19 a marqué un tournant dans la recherche biomédicale, prouvant l'efficacité de cette technologie contre les maladies infectieuses et ouvrant la voie à de nouvelles applications thérapeutiques.

Ce travail examine les possibilités offertes par l'ARN messager (ARNm) en tant que traitement innovant au-delà des vaccins. La méthodologie comprend trois axes : une recherche bibliographique pour établir l'état des connaissances actuelles, une analyse des études récentes pour évaluer les progrès scientifiques, et une comparaison critique des approches existantes pour identifier les forces et les limites des thérapies à base d'ARNm.

Les résultats montrent que l'optimisation des structures d'ARNm et le choix de vecteurs appropriés permettent son utilisation dans divers domaines thérapeutiques. Les essais cliniques démontrent un potentiel prometteur pour traiter des pathologies infectieuses et, en oncologie, des résultats encourageants indiquent que l'ARNm, combiné à d'autres traitements, pourrait améliorer la prise en charge des cancers au stade avancé.

En conclusion, bien que les thérapies à base d'ARNm offrent des perspectives prometteuses, il reste des défis à relever, notamment en matière de conception des systèmes d'administration et de sécurité à long terme. Les avancées dans ces domaines détermineront si l'ARNm pourra s'imposer comme un nouvel axe de traitement médical personnalisé.

**Mots-clés : ARNm, vaccin, traitements personnalisés, système immunitaire, essais cliniques**

### mRNA: A new drug candidate for the treatment of various diseases.

The rapid development of mRNA vaccines against COVID-19 marked a turning point in biomedical research, proving the efficacy of this technology against infectious diseases and opening the way to new therapeutic applications.

This work examines the potential of messenger RNA (mRNA) as an innovative treatment beyond vaccines. The methodology is threefold: a literature search to establish the current state of knowledge, an analysis of recent studies to assess scientific advances, and a critical comparison of existing approaches to identify the strengths and limitations of mRNA-based therapies.

The results show that the optimisation of mRNA structures and the choice of appropriate vectors enable it to be used in a variety of therapeutic areas. Clinical trials show promising potential for treating infectious diseases and, in oncology, encouraging results indicate that mRNA, combined with other treatments, could improve the management of advanced cancers.

In conclusion, although mRNA-based therapies offer promising prospects, challenges remain, particularly in terms of the design of delivery systems and long-term safety. Progress in these areas will determine whether mRNA can establish itself as a new area of personalised medical treatment.

**Keywords : mRNA, vaccine, personalized medicine, immune system, clinical trials.**