



Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**

N° d'ordre: \_\_\_\_\_

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

—

Les vaccins à ARN messager : l'évolution d'une technique

Présenté par

Clara PAILLER-PRADEAU

Soutenu le 21 novembre 2024 devant le jury constitué de

Pr Pauline SOULAS-SPRAUEL, Président

Dr Maria ZENIOU-MEYER, Directeur de thèse

Dr Philippe MAYER, Membre du jury

Approuvé par le Doyen et  
par le Président de l'Université de Strasbourg



## Liste du personnel enseignant

### Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Rascal	DIBIEH	Biophysique
Sali	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORGEL	Bactériologie, Virologie
Beatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Eliether	KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHIONI	Chimie analytique
Rachel	NATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Francois	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PABST	Droit Economie pharm.
Françoise	PONS	Toxicologie
Valérie	SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogalénique
Catherine	VONTRON	Pharmacognosie
Rascal	WEHRLE	Pharmacie galénique

### Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	CODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. Clinique santé publique
Hauine	SOLLAS-SPINADEL	Immunologie
Geneviève	UBSALDI-SÉQUIER	Pharmacocinétique

### Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMBERT	Pharmacie d'officine
Mathieu	FOHNER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAS	Droit et économie pharm.
Philippe	NANDE	Ingénierie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha	BATDOL	Biochimie
Martine	BEDGAENTZLE	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDI	Biophysique
Auréli	BOURDEROLLE	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIRER	Pharmacie biogalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Grégoire	HAAN-ARCHIROFF	Plantes médicinales
Cécile	JACQUEHARD	Chémoinformatique
Julie	KARRENRO	Pharmacochimie
Nathalie	NIEDERHOFER	Pharmacologie
Sergio	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	PERROTEY	Parasitologie
Romain	PERTSCH	Chimie en flux
Frédéric	PRZYWILLA	Biostatistiques
Patrice	SASSAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludvine	RIFFAULT-VALDES	Analyse du médicament
Carole	BONZAN	Toxicologie
Emilie	SICK	Pharmacologie
Youssef	SOUAIBOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria	SPANEIDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNSI	Chimie physique
Auréli	URBAN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Maria	ZEROU	Chimio génomique

### Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ETIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique
Vincent	SIES	Immunologie

### Assistants hospitaliers universitaires

Abdelmalek	BENJAMA	Production de médicaments anticancéreux
Maxime	PETIT	Pharmacotechnie
Damien	REITA	Biochimie



# SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit  
dans les préceptes de mon art et de  
leur témoigner ma reconnaissance en  
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,  
ma profession avec conscience et de respecter non  
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles  
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.



## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le docteur Maria Zeniou-Meyer, pour son soutien, ses conseils et sa patience tout au long de ce travail. Votre accompagnement a été essentiel pour mener à bien cette thèse.

Je remercie également les membres du jury, le professeur Pauline Soulas-Sprauel et le docteur Philippe Mayer, pour leur disponibilité et le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail.

À mes parents, Carine et Christophe, je vous dois énormément. Merci pour votre soutien indéfectible et vos encouragements tout au long de mes études. Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments difficiles où j'avais du mal à croire en moi-même et je vous en suis profondément reconnaissante. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis le début, et pour avoir toujours été là.

À mes amis, qui ont toujours su me soutenir et me rappeler de prendre des pauses bien méritées. Vous avez été là dans les moments de doute et de fatigue, prêts à m'écouter et à me redonner le sourire. Votre amitié a été un pilier essentiel tout au long de ce parcours.

Merci à tous.

## Table des matières

Liste du personnel enseignant .....	3
Serment de Galien.....	4
Remerciements.....	5
Table des matières.....	6
Liste des abréviations.....	10
Liste des figures .....	13
I. Introduction.....	15
II. L'état de l'art.....	15
1. De l'ADN à la protéine .....	15
a. La structure de l'ADN .....	15
i. La molécule d'ADN .....	15
ii. Les gènes.....	16
b. Acide ribonucléique messager.....	17
i. Qu'est-ce que l'ARNm ? .....	17
ii. Les composants de l'ARNm .....	17
c. La transcription.....	18
d. La traduction.....	19
2. Les grandes étapes de la recherche sur l'ARN messager.....	20
a. Le début de l'expression de protéines de lapin dans des cellules murines et humaines grâce à des ARNm encapsulés dans des liposomes.....	20
i. Marc Ostro et Giorgos Dimitriadis .....	20
ii. Insertion d'ARNm de globine de lapin dans une lignée cellulaire humaine à l'aide de liposomes .....	20
iii. Introduction d'ARNm de globine de lapin dans des lymphocytes murins à l'aide de liposomes .....	21
b. La première production d'ARNm de synthèse .....	22
i. Paul Krieg et Douglas Melton .....	22
ii. La production d'ARNm de synthèse.....	22
c. La première expression de protéines à l'aide d'ARNm.....	24
i. Robert Malone .....	24
ii. La transfection d'ARN médiée par des liposomes cationiques .....	25
d. L'utilisation d'ARNm pour remplacer la production déficiente d'une protéine .....	26
i. Gustav Jirikowski .....	26
ii. La correction du diabète insipide chez le rat Brattleboro par des injections intrahypothalamiques d'ARNm de vasopressine .....	27
e. Première preuve d'une réponse antivirale spécifique.....	28

i.	Pierre Meulien .....	28
ii.	L'induction d'une réponse virus-spécifique des lymphocytes T cytotoxiques suite à l'injection <i>in vivo</i> d'ARNm encapsulés dans des liposomes .....	28
f.	Une entreprise d'ARNm thérapeutiques.....	29
i.	Eli Gilboa.....	29
ii.	Les cellules dendritiques mises en contact avec de l'ARN sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	29
g.	L'induction d'une réponse immunitaire <i>via</i> les lymphocytes T et les anticorps .....	31
i.	Ingmar Hoerr .....	31
ii.	L'application <i>in vivo</i> d'ARN entraîne l'induction de lymphocytes T cytotoxiques et la production d'anticorps spécifiques .....	31
h.	L'ARNm modifié.....	32
i.	Katalin Karikó et Drew Weissman .....	32
ii.	L'activation des récepteurs Toll-like 3 (TLR3) par les ARNm endogènes .....	32
iii.	La suppression de la reconnaissance des ARN par les TLR grâce aux nucléosides modifiés 35	
iv.	Uridine et pseudouridine .....	37
i.	L'utilisation d'ARNm pour permettre la reprogrammation de cellules et la différenciation cellulaire.....	38
i.	Derrick Rossi .....	38
ii.	La reprogrammation hautement efficace vers la pluripotence cellulaire et la différenciation dirigée des cellules humaines grâce aux ARNm synthétiques modifiés.....	38
3.	La vaccination et les vaccins.....	41
a.	L'histoire de la vaccination .....	41
b.	Qu'est-ce qu'un vaccin ? .....	43
i.	De quoi sont composés les vaccins ?.....	43
ii.	Principes immunologiques de la vaccination.....	44
iii.	Vaccins prophylactiques et thérapeutiques .....	45
c.	Le développement d'un vaccin.....	46
i.	La recherche préclinique.....	46
ii.	La phase I.....	47
iii.	La phase II.....	47
iv.	La phase III .....	47
v.	La phase IV .....	47
vi.	Le challenge infectieux .....	48
4.	Les différents types de vaccins utilisés .....	49
a.	Les vaccins à pathogènes entiers .....	50
i.	Les vaccins vivants atténués.....	50

ii.	Les vaccins inactivés.....	51
b.	Les vaccins sous-unitaires .....	52
i.	Les vaccins à anatoxines.....	52
ii.	Les vaccins sous-unitaires à base de protéines (protéines purifiées et protéines recombinantes).....	52
iii.	Les vaccins sous-unitaires polysaccharidiques.....	53
iv.	Les vaccins sous-unitaires conjugués .....	53
c.	Les vaccins vectorisés.....	53
i.	Les vaccins à vecteur viral.....	53
ii.	Les vaccins à vecteur bactérien.....	54
d.	Les vaccins à particules pseudo-virales.....	54
e.	Les vaccins à cellules présentatrices d'antigènes .....	55
f.	Les vaccins à ADN .....	56
g.	Les vaccins à ARN messager .....	58
i.	La chronologie de la découverte des vaccins à ARNm .....	58
ii.	Qu'est-ce qu'un vaccin à ARNm ? .....	60
iii.	Vaccins à ARNm autoréplicatifs.....	62
iv.	Vaccins à ARNm trans-réplicatifs .....	64
v.	Profil immunologique des vaccins à ARNm.....	65
5.	Les vecteurs lipidiques.....	67
a.	Leur utilité .....	67
b.	Les différents vecteurs lipidiques utilisés.....	68
i.	Les liposomes .....	68
ii.	Les nanoparticules lipidiques.....	69
iii.	Les nano-émulsions.....	69
iv.	Les nanoparticules lipoïdes.....	70
v.	Les transporteurs à base de polymères.....	70
III.	Les vaccins contre la COVID-19 .....	71
1.	La COVID-19 .....	71
2.	Comirnaty® de BioNTech.....	74
a.	Vaccin original.....	74
b.	Vaccins prenant en compte la forme Omicron .....	76
3.	Spikevax® de Moderna .....	78
a.	Vaccin original.....	78
b.	Vaccins prenant en compte la forme Omicron .....	79
4.	Nuvaxovid® de Novavax.....	81
a.	Vaccin original.....	81



b.	Vaccin contre la souche Omicron.....	82
5.	JCOVDEN® de Janssen .....	82
6.	Vaxzevria® d'AstraZeneca.....	82
7.	Population vaccinée en France.....	83
8.	Production de vaccins à ARNm.....	84
9.	Les vaccins à ARNm contre la COVID-19, une mise sur le marché exceptionnellement rapide	86
IV.	Conclusion .....	88
V.	Discussion .....	89
1.	Comparaison avec les vaccins à ADN.....	89
2.	Quel avenir pour les vaccins à ARNm ?.....	90
a.	Les vaccins à l'étude.....	90
b.	Les défis des vaccins à ARNm .....	92

## **Liste des abréviations**

- \* ADN : Acide désoxyribonucléique
- \* ADNc : ADN complémentaire
- \* ARN : Acide ribonucléique
- \* ARNm : Acide ribonucléique messenger
- \* ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
- \* ARNt : Acide ribonucléique de transfert
- \* aSat : Saturation artérielle en oxygène
- \* BCG : Bacille Calmette et Guérin
- \* c-MYC : Proto-oncogène Myc
- \* CD : Cellules dendritiques
- \* CDS : Région codante
- \* circRNA : ARN circulaire
- \* CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- \* COVID-19 : Maladie au corona virus 19
- \* COVID-TEF : COVID-19 EMA pandemic Task Force
- \* CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
- \* CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- \* CSE : Eléments à séquence conservée
- \* DAMP : Motifs moléculaires associés aux dégâts
- \* DARPA : Defense Advanced Research Projects Agency
- \* Dextrane-DEAE : dextrane diéthylaminoéthyle
- \* dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate
- \* DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
- \* DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride
- \* DSPC : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- \* dsRNA : ARN double brin
- \* EMA : Agence européenne des médicaments
- \* FDA : Food and Drug Administration
- \* fHbp : Lipoprotéines de liaison au facteur H
- \* GOI : Gène d'intérêt
- \* GPI : Glycosylphosphatidylinositol
- \* GSK : GlaxoSmithKline
- \* Hep-2 : Cellules épithéliales humaines de carcinomes

- \* hES : Cellules souches humaines embryonnaires
- \* HPV : Papilloma Virus Humain
- \* hTERT : Transcriptase inverse de la télomérase humaine
- \* IFN- $\alpha$  : Interféron  $\alpha$
- \* IgG ou M : Immunoglobulines G ou M
- \* IL-8 ou 12 : Interleukine 8 ou 12
- \* IM : Intramusculaire
- \* iPS : Induced pluripotent stem cells
- \* IRAK-M : Kinase associée au récepteur de l'interleukine 1
- \* IRF-1 : Facteur 1 de régulation des interférons
- \* IV : Intraveineuse
- \* IVT : Transcrit *in vitro*
- \* KLF4 : Facteur 4 « Kruppel-like »
- \* LB : Lymphocyte B
- \* Leem : Les entreprises du médicament
- \* LPS : Lipopolysaccharide
- \* LTA : Acide lipotéichoïque
- \* LTh : Lymphocyte T helper
- \* m5C : 5-méthylcytidine
- \* m6A : N6-méthyladénosine
- \* m7G : N7-méthylguanosine
- \* MERS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
- \* NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire  $\kappa$ B
- \* NPL : Nanoparticules lipidiques
- \* nsP : Protéine non-structurale
- \* NTP : Ribonucléosides triphosphates
- \* OCT4 : Facteur 4 de transcription liant les octamères
- \* OMS : Organisation mondiale de la santé
- \* PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
- \* PCR : Réactions en chaîne par polymérase
- \* PDG : Président-Directeur Général
- \* PEG : Polyéthylène glycol
- \* PEG-PAsp : Polyéthylène glycol-polyaspartamide
- \* pH : Potentiel hydrogène

- \* PKR : Protéine kinase R
- \* pRB : Protéine du rétinoblastome
- \* PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
- \* RdRP : ARN-polymérase ARN-dépendante
- \* ROR : Rougeole, oreillons et rubéole
- \* RT-qPCR : PCR en temps réel couplée à une transcription inverse
- \* s2U : 2-thiouridine
- \* saRNA : ARN autorépliatif
- \* SC : Sous-cutanée
- \* SFV : Virus de la forêt de Semliki
- \* SOB : essoufflement
- \* SOX2 : Facteur 2 de transcription de la boîte SRY 2
- \* SP : Protéine structurale
- \* SP6 : Phage de salmonelle
- \* SRAS-CoV-2 : Syndrome respiratoire aigu sévère au coronavirus 2
- \* ssRNA : ARN simple brin
- \* STAT1 : Protéine transductrice de signal et activatrice de transcription 1
- \* TLR : Récepteurs Toll-Like
- \* TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2
- \* TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$
- \* UTR : Région non-transcrite
- \* VEEV : Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne
- \* VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
- \* VIS : Virus de l'immunodéficience simienne
- \* VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

## Liste des figures

- Figure 1 : Schéma de la double hélice d'ADN ..... 15
- Figure 2 : Les composants de l'ADN et de l'ARN ..... 16
- Figure 3 : Nucléoside et nucléotide ..... 16
- Figure 4 : Code génétique ..... 17
- Figure 5 : Épingle à cheveux ..... 18
- Figure 6 : ARN messager..... 18
- Figure 7 : Synthèse protéique ..... 19
- Figure 8 : Migration sur gel d'agarose des produits de transcription après injection d'ARNm dans des oocytes de grenouille ..... 23
- Figure 9 : Traduction d'ARNm synthétiques dans des extraits de germes de blé ..... 24
- Figure 10 : DOTMA ..... 25
- Figure 11 : L'efficacité de la transfection varie en fonction du ratio ARNm/Lipofectine ..... 26
- Figure 12 : Changement de l'osmolarité des urines des rats Brattleboro après injection intrahypothalamique de 5 µg d'ARN total hypothalamique et de 50 ng d'ARN de synthèse codant pour la vasopressine ..... 27
- Figure 13 : Comparaison du diamètre des métastases pulmonaires chez des souris afin de caractériser l'immunité antitumorale induite par une incubation unique de cellules dendritiques avec de l'ARN OVA ..... 30
- Figure 14 : Localisation et ligands des différents TLR ..... 34
- Figure 15 : Le blocage du signal au niveau des TLR3 inhibe l'activation des cellules dendritiques par l'ARNm ainsi que la production d'IFN-β par les cellules HEK293 surexprimant transitoirement TLR3 ..... 35
- Figure 16 : Uridine et Pseudouridine ..... 38
- Figure 17 : Caractérisation moléculaire des cellules iPS reprogrammées ..... 41
- Figure 18 : Histoire des découvertes et des grands noms de la vaccination ..... 43
- Figure 19 : Les différents types de vaccins ..... 50
- Figure 20 : Les stratégies de vaccination utilisant les cellules présentatrices d'antigènes ..... 56
- Figure 21 : L'électroporation ..... 58
- Figure 22 : Frise chronologique des vaccins à ARN ..... 60
- Figure 23 : Construction d'un ARNm ..... 61
- Figure 24 : Comparaison entre l'infection naturelle du coronavirus et la vaccination avec un ARNm ..... 62
- Figure 25 : Construction d'un ARNm autorépliquatif ..... 63

- Figure 26 : Différences intracellulaires entre les ARNm et les ARNsA ..... 64
- Figure 27 : Constructions de vaccins à ARNm autorépliquatif et trans-répliquatif ..... 65
- Figure 28 : Immunité contre la COVID-19 obtenue à l'aide de vaccins à ARNm ..... 67
- Figure 29 : Liposome contenant de l'ARN ..... 68
- Figure 30 : Nanoparticule lipidique encapsulant de l'ARNm d'ARNm ..... 69
- Figure 31 : Nanoémulsion avec de l'ARNm ..... 70
- Figure 32 : Nanoparticule lipoïde encapsulant de l'ARNm ..... 70
- Figure 33 : Nanoparticules à base de polymères encapsulant de l'ARNm ..... 71
- Figure 34 : Structure du SRAS-CoV-2 ..... 72
- Figure 35 : Phases cliniques de la COVID-19 ..... 74
- Figure 36 : L'ARNm du vaccin Comirnaty® ..... 75
- Figure 37 : Schéma comparant la composition des vaccins Comirnaty® (BNT162b2) de BioNTech/Pfizer et de Spikevax® (mRNA-1273) de Moderna ..... 76
- Figure 38 : Représentation graphique de l'analyse de la vaccination de la population française par type de vaccin pour la 2<sup>ème</sup> injection au 1<sup>er</sup> janvier 2023 ..... 84
- Figure 39 : Étapes de production et de purification du processus de fabrication des vaccins à ARNm ..... 86
- Figure 40 : Frise chronologique des essais pré-cliniques et cliniques des vaccins approuvés par l'OMS contre la COVID-19 ..... 88
- Figure 41 : Tableau comparatif des avantages et des inconvénients des vaccins à ADN et à ARNm ..... 90

## I. Introduction

Suite à l'émergence du syndrome respiratoire aigu sévère au coronavirus 2 (SRAS-CoV-2) et à la pandémie qui en a découlée, deux vaccins innovants ont été mis sur le marché. Quelle est leur spécificité ? Il ne s'agit pas de vaccins tels que nous les connaissons, vivants atténués, inactivés ou sous-unitaires, ils contiennent des acides ribonucléiques messagers (ARNm).

L'utilisation de cette nouvelle technique a suscité beaucoup d'interrogations, tant sur son efficacité que sur sa sécurité, mais cette technique peut-elle réellement être décrite comme nouvelle alors qu'elle est au cœur de nombreuses recherches depuis plus de 30 ans ?

Le développement d'une nouvelle technique, comme celle des vaccins à ARNm, demande des connaissances approfondies sur les éléments qui la composent, ainsi que des contributions scientifiques nombreuses et variées.

Le but de ce travail sera de détailler et de mettre en relation les différentes étapes de la recherche scientifique ayant permis d'aboutir à la mise sur le marché des premiers vaccins à acide ribonucléique (ARN) en 2020.

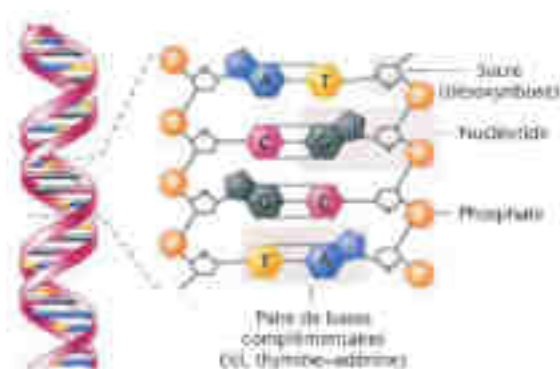
## II. L'état de l'art

### 1. De l'ADN à la protéine

#### a. La structure de l'ADN

##### i. La molécule d'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule portant l'information génétique. Il s'agit d'une molécule hélicoïdale d'un diamètre de 2,0 nm et formée de deux brins linéaires antiparallèles, eux-mêmes composés d'un enchainement de nucléotides, séparés par 0,34 nm, chaque tour de l'hélice mesure 3,4 nm et contient ainsi 10 nucléotides (*Figure 1*). Ces nucléotides comprennent trois éléments, un désoxyribose, une base azotée (*Figure 2*) et un groupement phosphate permettant la liaison des différents nucléotides entre eux (*Figure 3*). Quatre bases azotées différentes sont présentes au sein de l'ADN, l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine. La complémentarité des deux brins d'ADN repose sur la complémentarité des bases azotées, l'adénine avec la thymine et la cytosine avec la guanine, ce qui va permettre la formation de liaisons hydrogènes entre les brins[1](*Figure 1*).



*Figure 1* Schéma de la double hélice d'ADN, *Génétique 8<sup>ème</sup> édition de W. Klug, M. Cummings et C. Spencer, 2006*. Schéma représentant la structure de la double hélice de l'ADN avec un agrandissement montrant les nucléotides, les bases azotées, les phosphates et les liaisons hydrogène qui composent cette hélice.

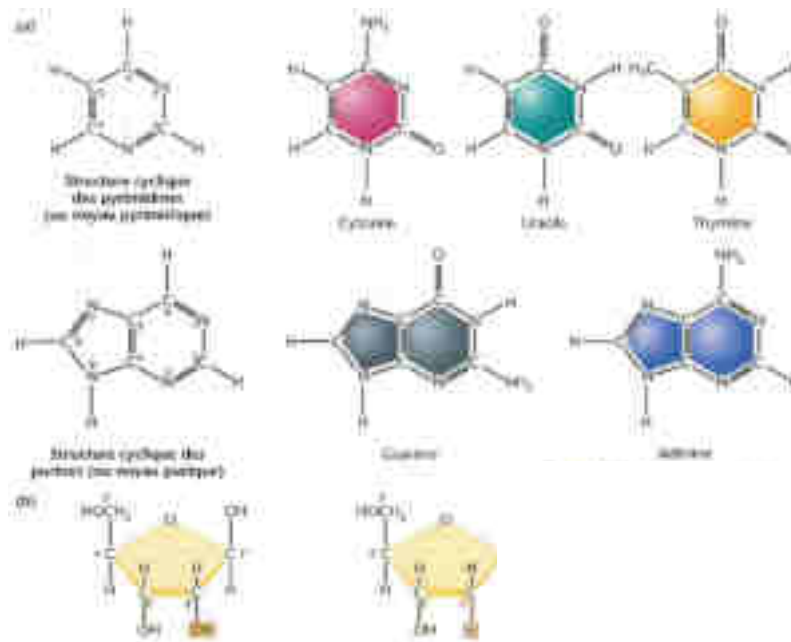


Figure 2 Les composants de l'ADN et de l'ARN, Génétique 8<sup>ème</sup> édition de W. Klug, M. Cummings et C. Spencer, 2006. Schéma représentant (a) la structure des bases azotées présentes dans l'ADN et/ou l'ARN et (b) la structure des sucres présents dans l'ARN (le ribose, à gauche) et l'ADN (le désoxyribose, à droite).

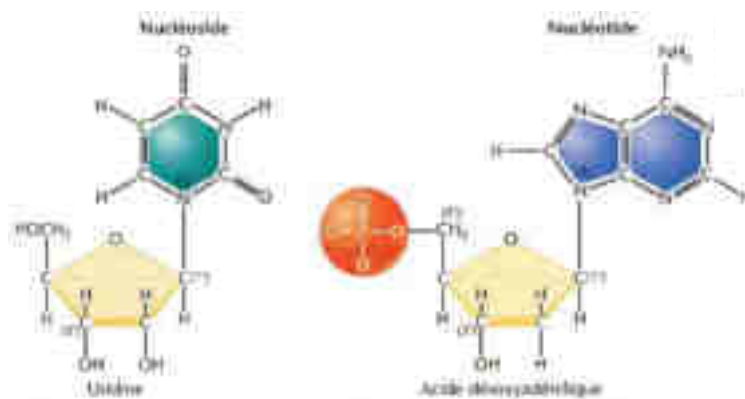


Figure 3 Nucléoside et nucléotide, Génétique 8<sup>ème</sup> édition de W. Klug, M. Cummings et C. Spencer, 2006. Schéma représentant un nucléoside formé d'un uracile et d'un ribose, et un nucléotide, formé d'une adénine, d'un désoxyribose et d'un groupement phosphate.

## ii. Les gènes

L'ADN humain comporte ainsi de nombreux gènes. Ces gènes se composent d'une région régulatrice comprenant des éléments appelés *enhancer* et *silencer* pouvant augmenter ou diminuer la transcription du gène ainsi que le promoteur du gène, de la région 5' non-traduite (5'UTR), du cadre de lecture commençant avec le codon initiateur (ATG) et se terminant par un codon Stop (TAA, TAG ou TGA), de la région 3' non-traduite (3'UTR) et d'une seconde région régulatrice en 3' pouvant elle aussi contenir des *enhancers* ou des *silencers*. Les gènes sont composés d'une alternance de séquences codantes, les exons, et non-codantes, les introns.



## b. Acide ribonucléique messenger

### i. Qu'est-ce que l'ARNm ?

L'acide ribonucléique messenger, souvent abrégé ARNm, a été découvert en 1961 par une équipe de l'Institut Pasteur. Il s'agit d'un intermédiaire entre l'ADN et les protéines produites par une cellule.

### ii. Les composants de l'ARNm

L'unité de base de l'ARN est le nucléotide tout comme pour l'ADN, cependant dans le cas de l'ARN les nucléotides peuvent contenir des bases azotées de type adénine, guanine, cytosine ou uracile et le désoxyribose de l'ADN est remplacé par un ribose (*Figure 2*).

L'enchaînement des nucléotides constitue la séquence primaire de l'ARN. Au sein de la région codante (CDS), les nucléotides sont assemblés 3 par 3 de façon à former des codons successifs. On distingue deux types de codons, ceux codant pour un des 20 acides aminés composant les protéines dont le codon initiateur AUG codant pour une méthionine et les codons STOP : UAG, UGA et UAA. La correspondance entre les codons et les acides aminés est décrite dans le code génétique (*Figure 4*). Celui-ci présente certaines redondances, plusieurs codons codent pour le même acide aminé puisqu'il existe 64 codons différents pour seulement 20 acides aminés, mais un codon ne code que pour un acide aminé précis.

		Seconde position				
		U	C	A	G	
U	UUU	UCU	UAU	UGU		
	UUC	UCC	UAC	UGC		
	UUA	UCA	UAA	UGA		
	UUG	UCG	UAG	UGG		
C	CUU	CCU	CAU	CGU		
	CUC	CCC	CAC	CCG		
	CUA	CCA	CAA	CCG		
	CUC	CCG	CAG	CCG		
A	AUU	ACU	AAU	AGU		
	AUC	ACC	AAC	AGC		
	AUA	ACA	AAA	AGA		
	AUG	ACG	AAG	AGG		
G	GUU	GCU	GAU	GGU		
	GUC	GCC	GAC	GCC		
	GUA	GCA	GAA	GCA		
	GUG	GCG	GAG	GCG		

Initiation (AUG)      Terminaison (UAA, UAG, UGA)

Figure 4 Code génétique, *Génétique 8<sup>ème</sup> édition de W. Klug, M. Cummings et C. Spencer, 2006.* Tableau exhaustif donnant la correspondance entre les codons de nucléotides de l'ARN et les acides aminés pour lesquels ils codent.

L'ARN possède une structure secondaire qui se met en place entre autres grâce à la présence de séquences répétées inversées qui peuvent s'associer par le biais des appariements de bases

complémentaires de manière à former une séquence double brin et qui vont ainsi constituer des structures dites en épingle à cheveux (*Figure 5*). D'autres types de liaisons hydrogène entre les nucléotides d'une même chaîne contribuent également à la structure secondaire de l'ARN. Plus les ARN sont longs, plus les structures secondaires formées peuvent être complexes : boucles multiples, internes ou terminales.



*Figure 5 Épingle à cheveux.* Schéma de séquences répétées inversées de bases de l'ARN formant une structure en épingle à cheveux.

La structure tertiaire des ARN est obtenue par des interactions plus complexes et parfois non conventionnelles reliant des parties plus distantes de la même molécule d'ARN ou rassemblant deux molécules d'ARN différentes.

La coiffe ajoutée très rapidement à l'extrémité 5' des pré-ARNm, composée d'un nucléotide de guanine modifié, a pour but de faciliter la maturation correcte du pré-messager, de le protéger de la dégradation par les ribonucléases et des phosphatases, de faciliter le passage de l'ARNm après l'épissage du noyau vers le cytoplasme et de recruter la petite sous-unité des ribosomes pour sa traduction en protéine.

La séquence polyA (environ 200 nucléotides) ajoutée en 3' de l'ARNm recrute des protéines permettant de le protéger *vis-à-vis* des ribonucléases lors de sa sortie du noyau vers le cytoplasme et lors de sa traduction.

### c. La transcription

L'ARNm chez les eucaryotes est linéaire et composé d'un seul brin (*Figure 6*). Il est produit dans le noyau au cours de la transcription par des ARN polymérases qui transcrivent l'ADN pour former un pré-ARNm, composé d'un 5' UTR, suivi d'une version primaire de la région codant pour la protéine contenant des introns entre les exons et d'un 3'UTR. Après sa synthèse dans le noyau, le pré-ARNm subit un épissage, ayant pour but d'enlever les introns afin de laisser place à une séquence codante finale, c'est-à-dire composée uniquement d'exons et contenant la séquence codante pour la protéine connue sous le nom de CDS. Une fois l'épissage achevé, l'ARNm est traduit en protéine par des ribosomes dans le cytoplasme ou au niveau du réticulum endoplasmique (*Figure 7*).



*Figure 6* ARN messenger, <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm#Hautpage>. Schéma récapitulatif des différents éléments de l'ARN messager mature après épissage : la coiffe en 5', le 5' UTR, la séquence codant pour la protéine, le 3' UTR et polyadénylation à son extrémité 3'.

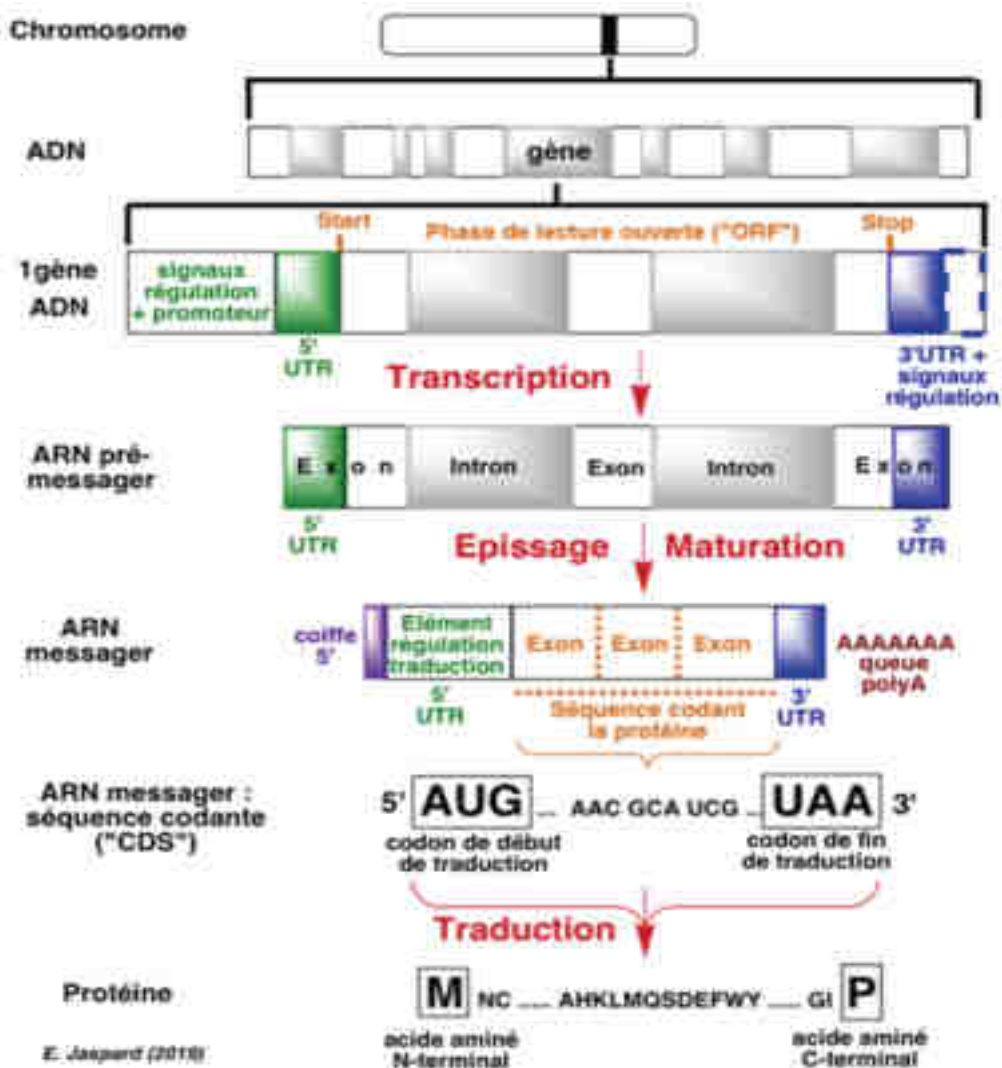


Figure 7 Synthèse protéique, Université d'Angers, <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm#Hautpage>. Schéma récapitulatif des différentes étapes menant à la synthèse protéique à partir de l'ADN, montrant ainsi le flux de l'information génétique. Au départ se trouve le gène, situé sur un chromosome, avec son cadre de lecture ouverte, qui est transcrit en ARN pré-messager. Celui-ci subit ensuite des étapes de maturation dont l'épissage au cours duquel les introns sont enlevés et l'ajout de la coiffe 5' et de la queue polyA pour obtenir un ARN messenger mature. Puis, la séquence codante de cet ARNm est traduite en protéine.

#### d. La traduction

La traduction correspond au processus permettant la production de protéines en assemblant des acides aminés en protéines à l'aide de ribosomes tout en respectant l'information génétique encodée par les ARNm.

Le ribosome est constitué de protéines ribosomales et de différents ARN ribosomiaux (ARNr). Il se compose de deux sous-unités, la grande et la petite. La grande sous-unité 60S comprend les ARNr 28 S,

5 S et 5,8 S ainsi que 49 protéines ribosomales. La petite sous-unité 40S se compose quant à elle d'un ARNr 18S et de 33 protéines ribosomales. Les ribosomes vont adapter un triplet nucléotidique de l'ARNm à l'acide aminé correspondant à l'aide d'ARN de transfert (ARNt).

La traduction se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Lors de l'initiation, l'ARNm va se lier à la petite sous-unité du ribosome à laquelle vont transitoirement se lier des facteurs de traduction. L'ARNt lié à la méthionine correspondant au codon initiateur se lie au complexe, auquel va venir s'ajouter la grande sous-unité, permettant la formation des sites peptidyl (P) et aminoacyl (A).

L'élongation correspond à la formation de la protéine à proprement parler suite à l'ajout successif d'acides aminés à l'aide des ARNt correspondants et de la peptidyl transférase qui permet la formation de la liaison peptidique entre ces derniers. L'ARNt initiateur se lie au site P, l'ARNt suivant se lie au site A, puis les deux acides aminés sont liés par la peptidyl transférase et la liaison entre la méthionine et son ARNt est hydrolysée. Ensuite, des facteurs d'élongation vont permettre le glissement du complexe ARNm-ARNt-AA2-Met de 3 nucléotides, permettant ainsi la fixation d'un 3<sup>ème</sup> ARNt correspondant au codon suivant. Cette réaction en chaîne se poursuit de cette manière jusqu'à ce que le ribosome arrive à la hauteur d'un des codon Stop pour lesquels il n'existe pas d'ARNt, il s'agit de l'étape de terminaison de la traduction. Des facteurs de terminaison recrutés au niveau du site A resté vide permettent de libérer l'extrémité Ct de la protéine synthétisée, puis les deux sous-unités du ribosome se séparent, libérant ainsi la protéine et permettant son repliement.

## 2. Les grandes étapes de la recherche sur l'ARN messenger

### a. Le début de l'expression de protéines de lapin dans des cellules murines et humaines grâce à des ARNm encapsulés dans des liposomes

#### i. Marc Ostro et Giorgos Dimitriadis

Marc Ostro est diplômé de l'Université Lehigh et de l'Université de Syracuse, aux Etats-Unis. Après avoir été professeur assistant à l'Université de l'Illinois aux Etats-Unis, il a co-fondé Liposome Co Inc en 1981. Il est désormais membre du conseil d'administration de ZS Pharma Inc, après avoir travaillé dans de nombreuses industries pharmaceutiques[2].

Giorgos Dimitriadis est un biologiste moléculaire et biochimiste grec, diplômé de l'Université de Patras en Grèce, où il a ensuite enseigné la biologie moléculaire et les biotechnologies.

#### ii. Insertion d'ARNm de globine de lapin dans une lignée cellulaire humaine à l'aide de liposomes

L'insertion d'ARNm dans de nombreuses cellules eucaryotes a permis l'étude des mécanismes moléculaire de la synthèse protéique. En 1978, quand Ostro et son équipe cherchent à insérer de l'ARNm

dans une cellule eucaryote, différentes techniques ont déjà été utilisées. Celles-ci incluent la micro-injection dans des oocytes de *Xenopus* ou dans des cellules eucaryotes différenciées, la co-culture de cellules avec de l'ARNm nu ou encore l'encapsulation de l'ARNm dans des érythrocytes fantômes, c'est-à-dire vidés de leur hémoglobine.

Ils décident néanmoins d'utiliser une nouvelle technique de vectorisation, les liposomes, pour cibler des cellules épithéliales humaines (HEp-2). L'ARNm codant pour la globine et encapsulé dans les liposomes a été isolé à partir de réticulocytes de lapins souffrant d'anémie induite par phénylhydrazine. Les liposomes ont ensuite été incubés avec les cellules Hep-2 avec et sans inhibiteurs de la transcription puis, les hépatocytes ont été lysés et les protéines purifiées afin de réaliser une électrophorèse des protéines produites par les cellules mises en contact avec les liposomes et par les cellules non-traitées.

Les cellules traitées par les liposomes contenant l'ARNm ont produit une protéine de globine qui n'est pas retrouvée dans les cellules non-traitées. Cependant, aucun tétramère de globine fonctionnel n'a été retrouvé, bien que les sous-unités soient produites.

Différents liposomes avaient déjà été utilisés au préalable : des liposomes multilamellaires de 500 Å de diamètre et de petits liposomes unilamellaires de 200 Å de diamètre, mais il n'avait pas été prouvé qu'ils puissent séquestrer des ARN de haut poids moléculaire. Pour cette étude, de grands liposomes unilamellaires produits par injection d'éther ont été utilisés et ont permis d'éviter des problèmes d'encombrement stérique et d'encapsuler de manière efficace les ARNm qui ont ensuite pu être insérés dans de nombreuses cellules de différents types[3].

### iii. Introduction d'ARNm de globine de lapin dans des lymphocytes murins à l'aide de liposomes

Dans cette étude de 1978, Dimitriadis et son équipe ont décidé d'utiliser une combinaison d'ARNm et d'enzymes permettant la traduction provenant de deux types cellulaires différents. Cette technique permet d'obtenir des informations sur l'ARNm, sur les espèces et sur la spécificité des acteurs de la traduction des différents types cellulaires.

Des études précédentes avaient déjà démontré la faisabilité d'une telle technique dans des oocytes de grenouilles, cependant les oocytes sont des cellules non-spécialisées. Le but de cette étude était donc d'étudier la faisabilité d'une telle technique dans des cellules différenciées, telles que les lymphocytes murins.

De grands liposomes unilamellaires ont été choisis pour protéger l'ARNm de l'action des ribonucléases. Ces liposomes ont été produits par sonication, puis les liposomes contenant de l'ARNm ont été séparés de ceux n'en contenant pas grâce à un passage sur colonne de sepharose-4B. Les lymphocytes murins ont ensuite été incubés avec les liposomes, avant d'être lavés et traités par sonication. Les protéines ainsi obtenues ont ensuite subi une électrophorèse qui a mis en avant la production d'une protéine proche de

la globine de lapin par les lymphocytes murins traités avec des liposomes contenant de l'ARNm. De cette façon, l'ARNm 9S extrait de réticulocytes de lapin a permis la production de globine dans des lymphocytes spléniques murins. Tous les composants de la traduction sont donc présents dans les cellules différenciées et permettent l'expression protéique, même entre deux espèces différentes.[4]

## **b. La première production d'ARNm de synthèse**

### **i. Paul Krieg et Douglas Melton**

Paul Krieg est un biologiste australien, diplômé de l'Université d'Adélaïde en Australie. Il est professeur de médecine cellulaire et moléculaire et de biologie cellulaire et moléculaire à l'Université d'Arizona aux Etats-Unis, ainsi que chercheur au Sarver Heart Center[5].

Douglas Melton est un biologiste américain, diplômé de l'Université de l'Illinois aux Etats-Unis. Il est connu grâce à ses travaux communs avec Paul Krieg sur la production d'ARNm à partir d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) chez les grenouilles. Il a fondé plusieurs sociétés de biotechnologies comme Gilead Sciences, Ontogeny (devenue Curis), iPierian (devenue True North Therapeutics) et Semma Therapeutics. Il est maintenant professeur de l'Université d'Harvard et a fondé la Société internationale pour la recherche sur les cellules souches[6].

### **ii. La production d'ARNm de synthèse**

Krieg et Melton sont les premiers à avoir réussi à synthétiser *in vitro* de l'ARNm fonctionnel en 1984. Ils ont mis en place une technique permettant de produire de grandes quantités (plusieurs microgrammes) d'ARNm eucaryote fonctionnel, dans des oocytes de grenouilles[7].

Pour ce faire, ils ont utilisé un vecteur de clonage du phage de la salmonelle (SP6), pSP64, dans lequel ils ont cloné l'ADNc de la  $\beta$ -globine de *Xenopus*, pSP64-X $\beta$ m. Dans un autre vecteur, pSP64T, ils ont inséré la séquence du gène humain codant pour l'interféron  $\beta$ .

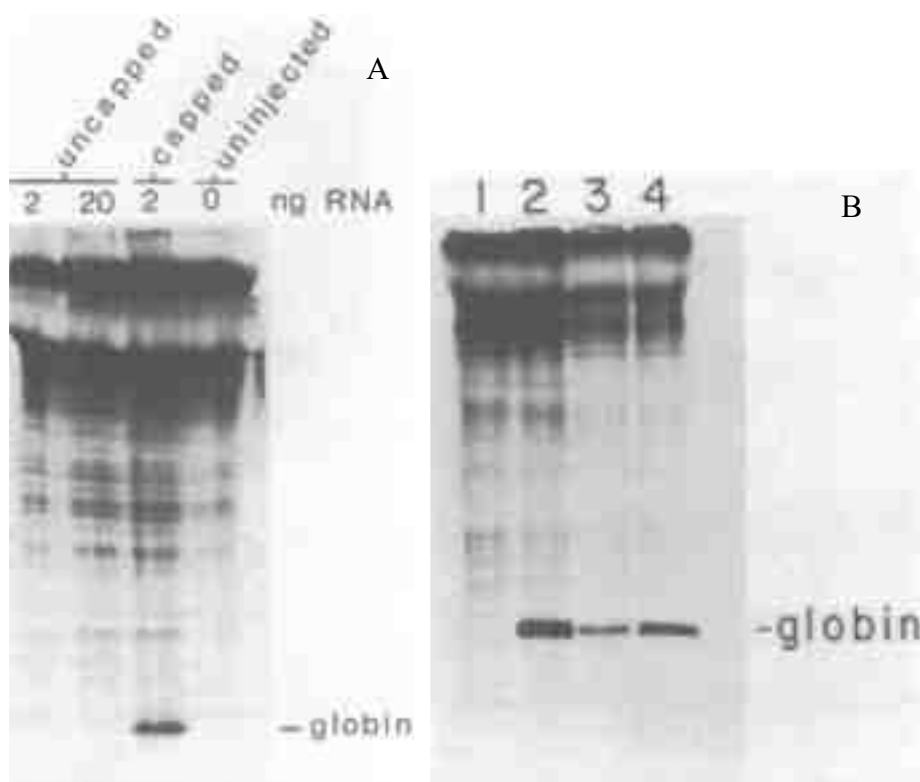
L'utilisation de l'ARN polymérase du bactériophage SP6 comme système de transcription *in vitro* permet l'obtention d'ARNm simple brin tout en s'affranchissant des contraintes liées à l'extraction et à la purification d'ARNm natifs[8]. Cette technique a permis d'étudier le devenir des ARNm, leur structure, leur traduction et leur épissage.

La synthèse utilisant une ARN polymérase provenant de *E. coli* ainsi qu'un promoteur procaryote était une alternative envisagée mais ce n'était pas la plus adaptée pour obtenir une quantité conséquente d'ARNm en raison de problèmes tels qu'une synthèse inefficace, la transcription des deux brins de l'ADN ou encore une initiation ou une terminaison incorrectes.

Le système SP6 utilise une combinaison spécifique de promoteur et d'ARN polymérase de *Salmonella typhimurium*. Cette ARN polymérase n'initie quasiment jamais de transcription avec un autre promoteur que celui de SP6 ou sur le mauvais brin de l'ADN. De plus, cette technique nécessite assez peu de

réactifs. Seuls un tampon de sels, l'ADN modèle, les ribonucléotides triphosphates et l'ARN polymérase sont nécessaires. Une purification pour enlever l'ADN modèle est réalisée à la fin à l'aide DNases sans RNases. Différents facteurs peuvent affecter la synthèse d'ARNm dans ce système. Ceux-ci incluent la concentration en ribonucléosides triphosphates (NTP), la spermidine, qui permet de stimuler la transcription, l'albumine de sérum bovin et la concentration d'ADN utilisée.

En plus de la synthèse d'ARNm, ces travaux ont permis d'étendre les connaissances disponibles sur les ARNm. Ils ont prouvé que la coiffe en 5' des ARNm est requise pour la stabilité dans les oocytes et donc pour la production protéique, bien que sa séquence importe peu. La séquence polyA en 3' des ARNm est quant à elle indispensable pour la stabilité des ARNm sur une durée de plusieurs jours mais joue un rôle moins important quand il s'agit de la stabilité à court terme de ces molécules (*Figure 8*).



*Figure 8 Migration sur gel d'agarose des produits de transcription après injection d'ARNm dans des oocytes de grenouille. D'après « Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs », P.A. Krieg and D.A. Melton 1984. [A] Injection de 2 et 20 ng d'ARNm non-capé et de 2 ng d'ARNm capé, ainsi que d'un contrôle. [B] Oocyte non-injecté (1) ; oocytes injectés avec de l'ARNm avec polyA isolé de globules rouges de grenouille anémique (2) ; oocytes injectés avec de l'ARNm de synthèse sans polyA (3) ; oocytes injectés avec de l'ARNm de synthèse avec polyA (4).*

Cependant, cette même étude a prouvé que la nécessité d'avoir ou non une coiffe en 5' dépend du système utilisé pour la traduction. En effet, dans les cellules de germes de blé, contrairement au cas observé dans les oocytes, la coiffe en 5' n'est pas indispensable puisque la protéine est produite aussi bien par l'ARN avec ou sans coiffe. Il faut tout de même noter que la quantité de protéine produite est supérieure avec un ARN protégé par une coiffe en 5' (*Figure 9*).

Enfin, ces études ont démontré que les ARNm synthétiques ainsi produits sont aussi stables dans les oocytes que les ARNm natifs[7].

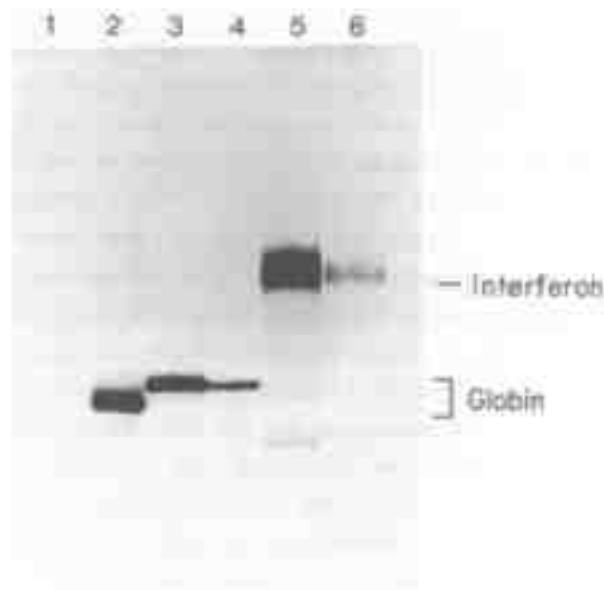


Figure 9 Traduction d'ARNm synthétiques dans des extraits de germes de blé. D'après « *Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs* », P.A. Krieg and D.A. Melton 1984. 100 ng d'ARNm ont été ajoutés aux extraits de germes de blé et les protéines ont été marquées avec de la <sup>33</sup>S-méthionine pendant 1h. les protéines ont été séparées par une électrophorèse sur gel. Puit 1 : contrôle sans ajout d'ARN. Puit 2 : contrôle d'ARN de globule rouge de lapin avec un polyA. Puit 3 : ARNm synthétique de globine de *Xenopus* transcrit à partir d'ADN pSP64-Xbm digéré par PstI, avec une coiffe en 5'. Puit 4 : ARNm synthétique de globine de *Xenopus* transcrit à partir d'ADN pSP64-Xbm digéré par PstI, sans une coiffe en 5'. Puit 5 : ARNm synthétique d'interféron transcrit à partir d'ADN pSP64T-IFN digéré par Sall, avec une coiffe en 5'. Puit 6 : ARNm synthétique d'interféron transcrit à partir d'ADN pSP64T-IFN digéré par Sall, sans une coiffe en 5'

### c. La première expression de protéines à l'aide d'ARNm

#### i. Robert Malone

Robert Malone est un virologue et un immunologiste américain, diplômé de l'Université de Californie et de l'Université de Northwestern, aux Etats-Unis.

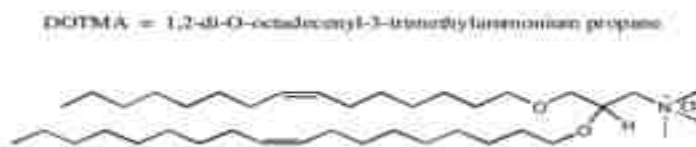
Il travaille d'abord en tant que chercheur au Salk Institute for Biological Studies avant de rejoindre Vical en 1989, qu'il quittera en août 1989 en raison de litiges concernant les brevets et la propriété intellectuelle de ses recherches sur les vaccins à ARNm.

À la suite de ça, il a travaillé en tant que directeur des affaires médicales chez Advancer Group, et en tant que membre du conseil scientifique d'EpiVax. Il a aussi enseigné dans différentes universités. Il a fondé Atheric Pharmaceuticals, qui a travaillé sur le virus Zika à la demande d'une agence gouvernementale américaine, la « Defense Advanced Research Projects Agency » (DARPA). Il est maintenant chef médical chez Alchem Laboratoires.



## ii. La transfection d'ARN médiée par des liposomes cationiques

L'équipe de Robert Malone du Salk Institute, a découvert en 1989 et perfectionné une méthode permettant la transfection de l'ARN de façon efficace et reproductible à l'aide de Lipofectin®, c'est-à-dire de liposomes contenant des lipides synthétiques cationiques, dans ce cas-ci des lipides de type DOTMA (*Figure 10*), N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride[9].



*Figure 10 DOTMA*, [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-DOTMA-and-DOPE-lipids\\_fig3\\_221819119](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-DOTMA-and-DOPE-lipids_fig3_221819119). Structure des lipides synthétiques cationiques de type DOTMA, utilisés par R. Malone pour la transfection d'ARNm.

Cette technique permet la transfection de 10 ng à 5 µg d'ARNm et a l'avantage d'être applicable à des cellules de différentes espèces telles que des cellules humaines, de rat, de souris, de *Xenopus* (Xénope) ou encore de drosophile. Au cours de leurs travaux, les chercheurs ont aussi étudié le rôle que jouent les différentes structures de l'ARNm telles que la coiffe et les UTR en 5' et 3' dans le processus de transfection.

Jusque-là, différentes méthodes avaient déjà été mises au point pour permettre l'introduction de matériel génétique, généralement de l'ADN en raison de sa stabilité, dans des cellules. Parmi ces méthodes se trouvent la complexation d'ADN de haut poids moléculaire avec du phosphate de calcium, du dextrane diéthylaminoéthyle (dextrane-DEAE), de la polylysine ou de la polyornithine, l'électroporation, la fusion de protoplastes ou fusion somatique, l'utilisation de liposomes ou d'enveloppes virales reconstituées, les vecteurs viraux ou encore les microinjections.

Le recours à la Lipofectin® a démontré son efficacité pour différents types cellulaires comme, par exemple, les fibroblastes, les cellules hématopoïétiques, les cellules de tératocarcinomes ou de choriocarcinomes, les cellules d'amphibiens ou les cellules d'insectes. Cependant l'utilisation de lipides cationiques se révèle cytotoxique, c'est pourquoi une optimisation adaptée au type cellulaire ciblé est nécessaire, afin de trouver le meilleur ratio  $\frac{\text{Lipofectin}}{\text{ARN}}$  (*Figure 11*). Pour les cellules murines utilisées dans cette étude, ce ratio était de 2,5 µg de Lipofectin® pour 1 µg d'ARN.

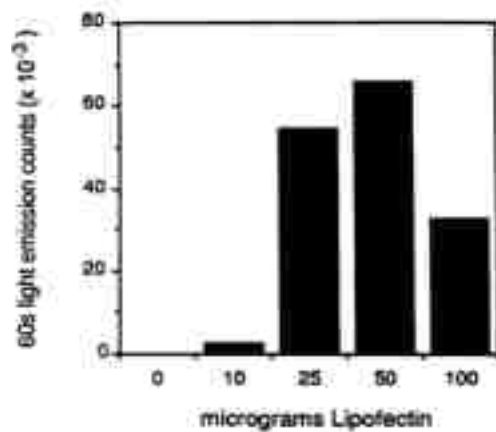


Figure 11 L'efficacité de la transfection varie en fonction du ratio ARNm/Lipofectine. D'après « Cationic liposome-mediated RNA transfection », Melton et al, 1989. Transfection de cellules NIH 3T3 avec 20 µg d'ARN complexé avec 0, 10, 25, 50 ou 100 µg de Lipofectin. Analyse de l'émission lumineuse de la luciférase de 30 µg de lysat cellulaire.

Il existe une relation linéaire entre la quantité d'ARN transfecté et la quantité de protéines traduites, que les chercheurs ont prouvé en transfectant 20 µg d'ARN puis en étudiant les cellules murines pendant 8h. En utilisant la complexation avec du dextrane DEAE dans les mêmes conditions, aucune protéine n'était détectable. En effet, la Lipofectin® a une efficacité 100 fois supérieure à celle de la complexation, une latence de 30 minutes est observée après la transfection, puis la production de protéines devient détectable. Cette expérience a aussi prouvé qu'une partie de l'ARN restait fonctionnelle pendant plus de 5h. Pour vérifier l'efficacité de la transfection de l'ARN les chercheurs ont étiqueté de l'ARN avec un composant radioactif. Cela leur a permis de démontrer qu'en 1h, 60% de l'ARN était associé aux cellules et que 20 à 30% avait été endocyté, car il était devenu résistant aux RNases. La rapidité de cette réaction correspond à des interactions ioniques entre le DOTMA et les membranes cellulaires. Quasiment tous les types cellulaires testés ont présenté une production de protéines après 8h, avec des efficacités différentes. Afin d'améliorer l'efficacité, le ratio  $\frac{\text{Lipofectin}}{\text{ARN}}$  a dû être optimisé pour chaque type cellulaire.

Pour étudier l'importance de la coiffe et des régions 5'UTR et 3'UTR pour la transfection, différents ARN ont été préparés, avec ou sans chacun de ces éléments. La transfection maximale a été atteinte avec les ARN possédant ces 3 structures (100 fois supérieure à la transfection ayant lieu en l'absence de ces éléments).

#### **d. L'utilisation d'ARNm pour remplacer la production déficiente d'une protéine**

##### **i. Gustav Jirikowski**

Gustav Jirikowski est un biologiste autrichien, ayant étudié à l'Université de Salzbourg en Autriche. Il a travaillé en tant que professeur assistant à l'Université d'Ulm en Allemagne et à l'Université de

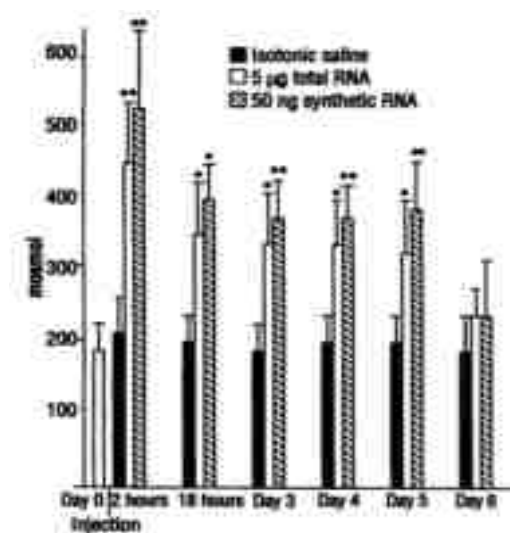
Caroline du Nord aux Etats-Unis, au Scripps Institute comme chercheur, ainsi qu'à l'Institut Max Planck[10].

## ii. La correction du diabète insipide chez le rat Brattleboro par des injections intra-hypothalamiques d'ARNm de vasopressine

Le diabète insipide peut être dû à un défaut de production par l'hypothalamus de vasopressine, une hormone antidiurétique, ou à une résistance du rein à la vasopressine. Dans le cas de l'étude qui sera décrite ici il s'agit d'un défaut de production de vasopressine par les neurones magnocellulaires qui sont aussi responsables de la production de l'ocytocine. En effet, les rats Brattleboro ont une mutation génétique (délétion d'une base) empêchant la production de vasopressine.

Le Dr Jirikowski et son équipe ont démontré en 1992 que suite à une injection intra-hypothalamique d'ARNm, purifié ou synthétique, codant pour la vasopressine, une capture et un transport rétrograde de cet ARNm jusqu'à l'hypothalamus avait lieu. Pour cela les chercheurs ont eu recours à des techniques d'immunoprécipitation et de radiomarquage de l'ARNm. Ce transport rétrograde est suivi de l'expression de la vasopressine dans les neurones magnocellulaires et d'une correction du diabète pendant une période pouvant aller jusqu'à cinq jours[11] (*Figure 12*). Il est à noter que le suivi des ARNm exogènes codant pour la vasopressine est possible en raison de la faible activité des RNases cérébrales.

Cette étude est la première à prouver la faisabilité de la correction de l'expression défailante d'une protéine par l'administration *in vivo* d'ARNm.



*Figure 12* Changement de l'osmolarité des urines des rats Brattleboro après injection intra-hypothalamique de 5 µg d'ARN total hypothalamique et de 50 ng d'ARN de synthèse codant pour la vasopressine. D'après « *Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA* », G.F. Jirikowski et al, 1992. Les rats sont des mâles souffrant de diabète insipide et pesant entre 250 et 260g.

## e. Première preuve d'une réponse antivirale spécifique

### i. Pierre Meulien

Pierre Meulien est un biologiste diplômé de l'Université de Liverpool au Royaume-Uni en microbiologie et de l'Université d'Édimbourg au Royaume-Uni en biologie moléculaire. Il a travaillé en tant que directeur de recherches chez Sanofi en France et au Canada, puis il a été président directeur général (PDG) du Centre de médecine moléculaire de Dublin, chez Genome British Columbia en tant que directeur scientifique et chez Genome Canada en tant que PDG.

Depuis 2015, il est à la tête de l'Innovative Medicines Initiative à Bruxelles qui est un partenariat entre l'Union Européenne et les industries de santé[12].

### ii. L'induction d'une réponse virus-spécifique des lymphocytes T cytotoxiques suite à l'injection *in vivo* d'ARNm encapsulés dans des liposomes

Cette étude menée en 1993 par Pierre Meulien a mis en évidence l'induction de lymphocytes T cytotoxiques, suite à l'injection sous-cutanée chez des souris d'ARNm codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe encapsulé dans des liposomes[13]. Cette protéine joue un rôle important dans les interactions entre le virus et la cellule hôte mais aussi dans les interactions entre les différentes molécules virales. Elle permet la réplication de l'ARN viral en se liant à ce dernier ainsi qu'à la polymérase. Au niveau cellulaire, la nucléoprotéine se lie notamment à l'actine.

Dans cette étude, les liposomes étaient composés de cholestérol, de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine. Cette technique a permis d'induire la production de lymphocytes T cytotoxiques identiques à ceux induits par une infection du virus de l'*Influenza*.

Les lymphocytes T cytotoxiques participent à la réponse antivirale en reconnaissant les protéines virales associées aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Les virus vivants atténués entraînent une réponse légèrement supérieure mais font encourir un risque d'infection au patient qui ne peut pas être pris avec tous les virus, notamment avec celui de l'immunodéficience humaine.

Pour tester l'activité cytotoxique des lymphocytes T amorcés, des cellules spléniques de rats ayant reçu les liposomes auparavant ont été prélevées et mises en contact avec le virus. Les lymphocytes T ainsi amorcés ont une activité équivalente à celles des lymphocytes T prélevés chez des souris ayant été contaminées par le virus.

De plus, la protéine traduite à partir des ARNm est prise en charge par des mécanismes intracellulaires de la même manière que les protéines virales. Dans ce cas précis, les ARNm nus n'induisaient pas de réponse cytotoxique, ce qui explique le choix de l'encapsulation dans des liposomes, qui après injection sous-cutanée ou intraveineuse sont drainés vers les organes lymphoïdes secondaires où ils sont fortement captés par des macrophages permettant d'initier des réponses de classe I du CMH.

Cette étude est la première à avoir démontrée l'induction d'une réponse virus-spécifique des lymphocytes T cytotoxiques *in vivo* suite à l'administration d'ARNm.

## f. Une entreprise d'ARNm thérapeutiques

### i. Eli Gilboa

Eli Gilboa est un biologiste moléculaire israélo-américain, diplômé de l'Institut Weizmann en Israël. Il fut d'abord professeur assistant à l'Université de Princeton aux Etats-Unis avant de rejoindre l'Université de Duke aux Etats-Unis pour y mener des recherches sur les thérapies géniques. En 2006, il a été nommé professeur de microbiologie et d'immunologie à l'Université de Miami aux Etats-Unis où il travaille au développement d'immunothérapies anticancéreuses[14].

### ii. Les cellules dendritiques mises en contact avec de l'ARN sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes, *in vitro* et *in vivo*

Eli Gilboa et son équipe ont démontré en 1996 que des cellules dendritiques (CD) incubées avec de l'ARN tumoral sont capables d'induire une réponse cytotoxique des lymphocytes T ainsi qu'une immunité protectrice antitumorale [15].

L'idée de départ de ces travaux étant d'utiliser la capacité des CD à présenter les antigènes aux cellules T naïves ou quiescentes. Tout d'abord, les CD ont été incubées avec des antigènes tumoraux peptidiques ou protéiques, il a alors été démontré qu'une vaccination avec des antigènes tumoraux multiples s'avérait plus efficace qu'avec un seul épitope.

L'utilisation de peptides ou de protéines non-fractionnés a démontré une immunité protectrice. Cependant, cette technique s'avère moins efficace en raison de la concentration plus faible en antigènes effecteurs de la réponse immunitaire. De plus, elle dépend fortement de la disponibilité des tissus cancéreux chez les patients. En effet, certaines tumeurs sont difficiles d'accès ou trop petites pour permettre une extraction de tissus suffisante et le risque de provoquer des réponses auto-immunes est plus élevé à cause de la présence d'antigènes du soi.

L'utilisation d'ARNm peut permettre d'éviter ces potentiels problèmes. En effet, les ARNm peuvent fournir une quantité d'antigènes suffisante au traitement à partir de peu de cellules et donc à partir de quantités microscopiques de tissu tumoral. En cas de réaction auto-immune trop importante, la quantité d'antigènes du soi peut être réduite par hybridation soustractive. Pour ce faire, des séquences nucléotidiques complémentaires aux ARNm du soi sont fixées sur des billes permettant ainsi la capture des ARNm du soi et de ne garder que les ARNm tumoraux.

Au cours de cette étude, la capacité des CD spléniques de souris mises en contact avec l'ARN codant pour l'ovalbumine de poulet à présenter les antigènes a été mesurée à travers leur capacité à induire une réponse immunitaire cytotoxique *in vitro* et une régression des métastases pulmonaires spontanées de

mélanomes *in vivo*. Les CD incubées avec de l'ARN synthétisé codant pour l'ovalbumine de poulet ont démontré une capacité supérieure à celle des CD incubées avec le peptide lui-même ou avec l'ARN total extrait à induire une réponse cytotoxique grâce aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Pour ce qui est de la capacité des CD à induire une immunité antitumorale, celles ayant été incubées avec de l'ARN total ou fractionné extrait de cellules cancéreuses induisent une réponse équivalente aux CD ayant été mises en contact avec des cellules cancéreuses. Ce sont les CD incubées avec de l'ARN synthétisé *in vitro* qui induisent la meilleure protection. Pour mesurer ce paramètre, des cellules tumorales ont été implantées dans les pattes des souris. Une fois la tumeur ayant atteint une certaine taille, elle a été enlevée chirurgicalement et deux jours plus tard les souris ont été immunisées soit avec des cellules cancéreuses irradiées, soit avec des CD incubées avec de l'ARN tumoral. Les souris immunisées par les CD ont présenté une régression drastique de métastases pulmonaires, contrairement à celles traitées avec les cellules cancéreuses irradiées (Figure 13).

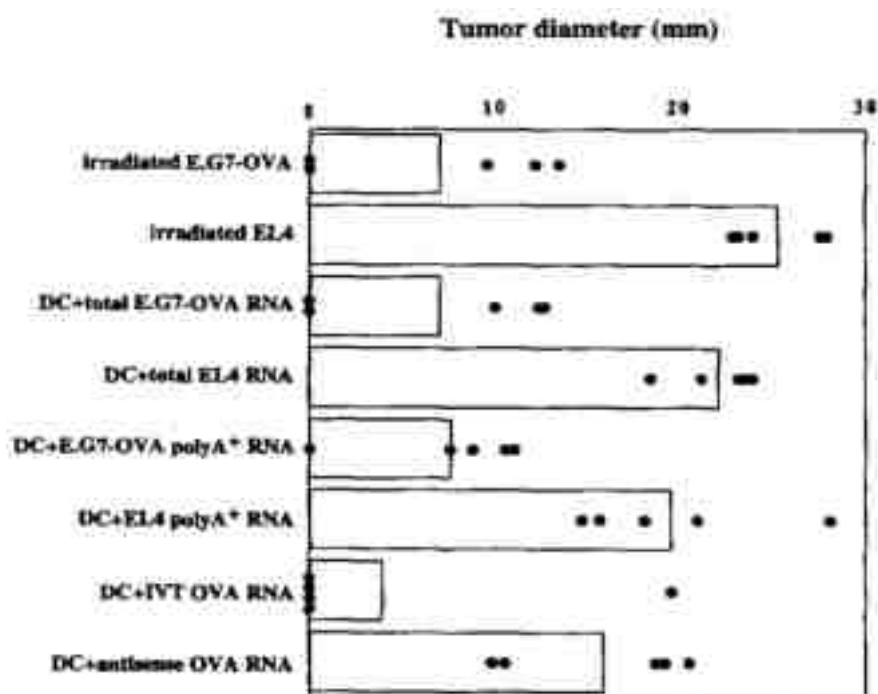


Figure 13 Comparaison du diamètre des métastases pulmonaires chez des souris afin de caractériser l'immunité antitumorale induite par une incubation unique de cellules dendritiques avec de l'ARN OVA. D'après « Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo* », D. Boczkowski *et al*, 1996. Les cellules dendritiques ont été incubées soit avec de l'ARN total ou polyA<sup>+</sup> provenant de cellules E.G7-OVA ou EL4 soit avec de l'ARN OVA transcrit *in vitro* (IVT), soit avec de l'ARN OVA anti-sens transcrit *in vitro* qui sert de contrôle. Les souris ont été immunisées avec  $2 \times 10^6$  cellules dendritiques ou  $5 \times 10^6$  cellules irradiées E.G7-OVA ou EL4, par injection intrapéritonéale, suivi d'un test avec  $2 \times 10^7$  cellules E.G7-OVA. Les colonnes représentent le diamètre moyen de la tumeur (5 souris/groupe) et les points représentent les mesures individuelles. Les souris ont été examinées régulièrement pour la croissance de la tumeur et ont été tuées quand le diamètre de la tumeur atteignait 3-4 cm. Toutes les souris ont été tuées entre 35 et 40j après le test.

Les travaux de Gilboa et de son équipe ont donc mis à jour la capacité des CD incubées avec de l'ARN à induire efficacement la présentation d'antigènes grâce aux molécules du CMH de type I ainsi qu'à induire une réponse cytotoxique.

D'après les conclusions des chercheurs, l'efficacité supérieure de l'ARN par rapport aux peptides serait due au fait que l'ARN permet une production d'antigènes sur un certain laps de temps, et donc une quantité supérieure à celle fournie ponctuellement par un peptide.

### **g. L'induction d'une réponse immunitaire *via* les lymphocytes T et les anticorps**

#### **i. Ingmar Hoerr**

Ingmar Hoerr est un biologiste allemand ayant étudié à l'Université de Tübingen en Allemagne et à l'Université du Danube en Autriche. En 2000, il a fondé, avec deux de ses collègues, la société biopharmaceutique CureVac dont il a été le président-directeur général (PDG) pendant 19 ans[16].

#### **ii. L'application *in vivo* d'ARN entraîne l'induction de lymphocytes T cytotoxiques et la production d'anticorps spécifiques**

Le but de cette étude était de démontrer l'efficacité des vaccins à ARN[17]. Pour ce faire, les chercheurs ont eu recours à des ARN codant pour la  $\beta$ -galactosidase, transcrits *in vitro* à partir du gène *lacZ*, et flanqués en 5' et en 3' par des séquences stabilisatrices de  $\beta$ -globine de *Xenopus laevis*. Ces ARN ont ensuite été injectés à des souris sous trois formes différentes : des complexes ARN-protamine contenus dans des liposomes, des complexes ARN-protamine seuls, ou de l'ARN nu non-condensé à la protamine. La protamine, une protéine liant l'ADN riche en arginine, est utilisée ici dans le but de protéger l'ARN contre la dégradation par des RNases. Au cours de cette étude, des ARN entiers condensés à la protamine sont encore retrouvés 60 min après injection alors que les ARN nus sont dégradés en quelques minutes. En effet, l'ARN est facilement hydrolysé par des ribonucléases ubiquitaires, ce qui explique que les vaccins à ARN aient été un temps délaissés au profit des vaccins à ADN, plus stables mais présentant des risques tels que l'intégration de la séquence au génome, pouvant ainsi mener à l'inactivation de certains gènes et/ou à des effets oncogènes. Cependant, les vaccins à ARN possèdent leurs propres avantages, puisqu'ils peuvent être produits en grande quantité et qu'ils ne présentent pas de risque d'intégration au génome.

Une première étape de cette étude a consisté en l'électroporation de cellules Hela-KB pour permettre la pénétration de l'ARN à l'intérieur de ces dernières. Ces cellules ont ensuite été injectées à des souris chez qui elles ont entraîné une réponse spécifique de lymphocytes T cytotoxiques comparable à celle induite par des CD ayant préalablement été transfectées *in vitro* avec l'ARN.

Suite à ça, l'injection d'ARN sous les trois formes préalablement citées a été testée. L'injection intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM) de 30  $\mu$ g d'ARN condensés à la protamine et contenus dans

de l'Unifectin (lipides cationiques), a permis d'obtenir une réponse spécifique de lymphocytes T cytotoxiques. L'injection IV, sous-cutanée (SC) ou IM de 30 µg d'ARN condensé à la protamine mais sans lipides cationiques n'a pas permis d'obtenir de réponse spécifique de lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, une telle réponse a été observée suite à une injection de cette solution dans le pavillon de l'oreille des souris, ce qui est comparable à une injection intradermique chez l'Homme, démontrant ainsi l'importance du choix du point d'injection. Enfin, l'injection d'ARN nu non-condensé a déclenché une réponse spécifique de lymphocytes T cytotoxiques seulement quand elle était faite directement après la préparation de l'ARN[17].

Tandis que l'utilisation d'ARN nu ne semble pas avoir d'avenir en clinique pour des raisons logistiques, la condensation de l'ARN avec la protamine étudiée ici est une alternative intéressante puisque l'absence d'immunoglobulines G (IgG) dirigées contre la protamine chez les sujets contrôles indique que cette dernière n'est pas immunogène.

#### **h. L'ARNm modifié**

##### **i. Katalin Karikó et Drew Weissman**

Katalin Karikó est une biochimiste hongroise qui a co-fondé RNARx en 2006 et qui est vice-présidente de BioNTech depuis 2013. De plus, elle est professeur adjointe de l'Université de Pennsylvanie aux Etats-Unis dans laquelle elle travaille depuis 1989. Elle a fait ses études à l'Université de Szeged en Hongrie[18].

Drew Weissman est un médecin et chercheur américain travaillant à l'Université de Pennsylvanie aux Etats-Unis. Il est connu pour ses travaux sur l'ARNm qu'il a réalisé avec sa collègue Katalin Karikó. Avant cela, il a travaillé au National Institutes of Health sur le VIH. Il est diplômé de l'Université Brandeis aux Etats-Unis et de l'Université de Boston aux Etats-Unis[19].

##### **ii. L'activation des récepteurs Toll-like 3 (TLR3) par les ARNm endogènes**

Les Récepteurs Toll-Like (TLR) interviennent dans l'immunité innée et sont activés suite à la reconnaissance de motifs moléculaires propres aux différents agents pathogènes (PAMP) ou par des cellules de l'hôte endommagées relarguant leurs ARNm (DAMP)[20]. Ces motifs peuvent aussi bien être viraux, bactériens ou parasitaires. Il peut s'agir d'ADN, d'ARNm double brin, du lipopolysaccharide (LPS), de protéines, de sucres ou d'acides nucléiques (*Figure 14*). Une fois les motifs reconnus, la réponse immunitaire innée est déclenchée *via* l'activation de facteurs de transcription tels le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ou le facteur 1 de régulation des interférons (IRF-1).



Pour ce qui est de l'activation des TLR par l'ARNm double brin, celui-ci peut être viral, bactérien ou humain. En effet, même si l'ARNm de cellules de mammifères est simple brin sa structure secondaire peut lui conférer de courtes séquences double brin.

Suite à la liaison avec un ligand, les TLR activent différentes voies de signalisation induisant la différenciation cellulaire, une activité antimicrobienne et des processus inflammatoires.

Ces récepteurs se présentent sous forme d'homodimères le plus souvent, certains d'entre eux forment cependant des hétérodimères. Ils sont transmembranaires et possèdent un domaine extracellulaire riche en leucines ainsi qu'un domaine intracellulaire contenant un « death domain » qui est activé après la reconnaissance d'un motif moléculaire par le récepteur[21].

À ce jour, 10 TLR différents ont été identifiés chez l'être humain, ils sont répartis en deux groupes, les TLR de surface, qui se trouvent à la membrane plasmique, et les TLR endosomaux, localisés à la membrane des endosomes.[22]

Les TLR de surface regroupent les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10 formant les dimères suivants : TLR1/2, TLR2/6, TLR2/10, TLR4 et TLR5, les deux derniers formant des homodimères. Les TLR1/2 reconnaissent les peptidoglycanes bactériens ; les TLR2/6 reconnaissent les lipopeptides bactériens, le zymosane des levures, l'acide lipotéichoïque (LTA) bactérien et l'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) des membranes cellulaires ; les TLR2/10 reconnaissent les lipoglycanes bactériens ; les TLR4 reconnaissent le LPS bactérien et les TLR5 reconnaissent la flagelline bactérienne.

Les TLR endosomaux comprennent trois homodimères, les TLR3, 4 et 9, et l'hétérodimère TLR7/8. Les TLR3 reconnaissent l'ARN viral double brin ; les TLR4 reconnaissent le LPS comme à la membrane plasmique ; les TLR9 reconnaissent les motifs d'ADN hypométhylés mais riche en CpG qui sont fréquent chez les bactéries et les TLR7/8 reconnaissent l'ARN viral simple brin (*Figure 14*).[22], [23]

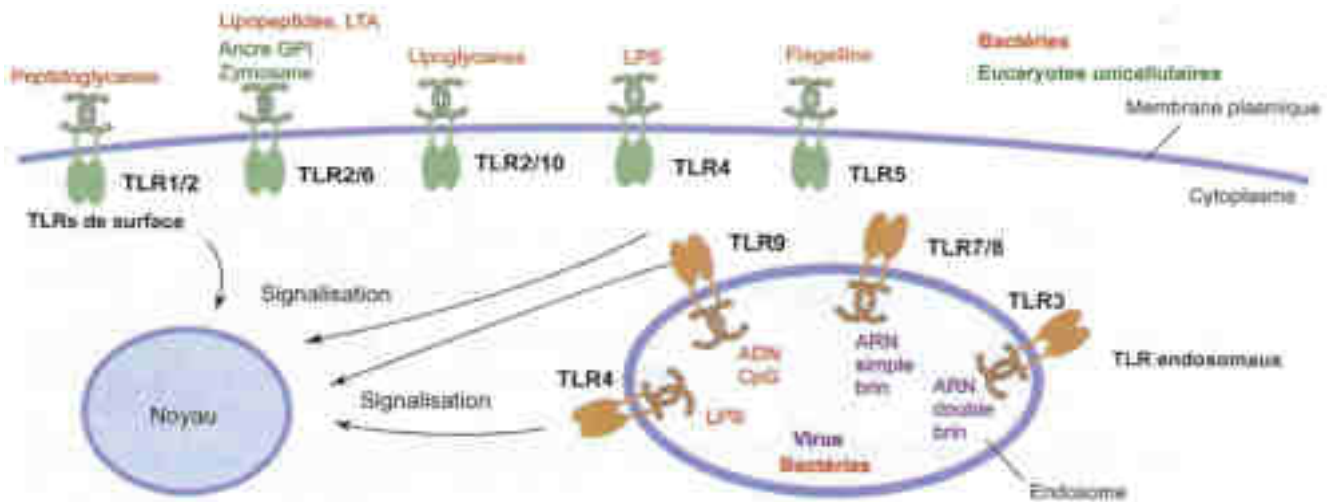


Figure 14 Localisation et ligands des différents TLR, d'après « Atlas d'immunologie: de la détection du danger à l'immunothérapie » de F. Gros, S. Fournel, S. Liégeois, D. Richard et P. Soulas-Sprauel. Les TLR se répartissent en 2 groupes, les TLR de surface et les endosomaux. Les TLR de surface reconnaissent des éléments des membranes bactériennes ou fongiques, tandis que les endosomaux reconnaissent majoritairement le matériel génétique (ARN et ADN) ;

L'activation des TLR peut induire plusieurs réactions différentes : la phagocytose d'un pathogène bactérien, une réaction inflammatoire *via* la sécrétion de cytokines, l'apoptose d'une cellule infectée par un virus ou le relargage d'interférons.

Les TLR sont, entre autres, exprimés par les CD immatures et permettent le passage entre l'acquisition des antigènes et leur présentation.

Pour démontrer l'activation des TLR3 par l'ARN, les chercheurs ont utilisé des cellules humaines embryonnaires de rein exprimant les TLR3 de façon stable (cellules TLR3-293), ainsi que l'expression dépendante du facteur nucléaire  $\kappa B$  d'un gène rapporteur codant pour la luciférase. Cette enzyme permet la production de bioluminescence en transformant la luciférine en oxyluciférine. L'activité de la luciférase a permis de prouver en 2004 l'activation dose-dépendante des TLR3 par les ARNm transcrits *in vitro*.

De plus, les CD ont elles aussi exprimé des marqueurs d'activation suite à une exposition à des ARNm transcrits *in vitro* et cette activation disparaissait en présence d'anticorps antagonistes anti-TLR3. Une des hypothèses avancées pour expliquer l'activation de ces cellules par des ARNm transcrits *in vitro*, mais pas par les ARNm de l'hôte, est qu'elle est liée à la structure secondaire des ARNm qui varie en fonction de la méthode de transcription de l'ADN.

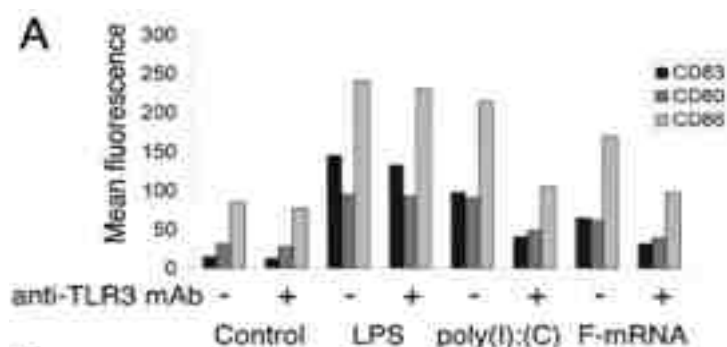
Dans les cellules TLR3-293, les ARNm transcrits *in vitro* activent la voie NF- $\kappa B$ , tandis que les ARNm avec une queue polyA activent les CD par la détection du polyA par le récepteur purinergique couplé aux protéines G P2Y ainsi que par la sécrétion du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). La présence d'une coiffe ou d'une queue polyA n'est pas indispensable pour la signalisation *via* les TLR3[20].

Un traitement des CD par ARNm entraîne une accumulation d'ARNm codant pour différentes protéines dans ces dernières, tels qu'IRF-1, la kinase associée au récepteur de l'interleukine-1 (IRAK-M), TNF- $\alpha$  et TLR3. La sécrétion d'interleukine 8 (IL-8) induite par les ARNm dépend de la phosphorylation des tyrosines, mais pas de la protéine kinase R (PKR) prouvant ainsi que l'augmentation de la production d'IL-8 n'est pas due à l'action directe de l'ARNm sur la PKR mais bien par la signalisation passant par les TLR3.

Les cellules nécrotiques peuvent activer les CD par différents biais, par exemple par l'intermédiaire de leurs ARN, mais les cytokines sécrétées par les CD diffèrent. Avec la participation des ARN, les cellules produisent de hauts taux d'interleukine 12 (IL-12) et d'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), tandis que la suppression des ARN par traitement à la benzonase nucléase entraîne une baisse des taux d'IL-12 et un retour à des taux d'IFN- $\alpha$  correspondant à ceux de cellules non-stimulées.

L'utilisation d'anticorps antagonistes anti-TLR3 bloquant l'activation des CD, prouve que cette activation se fait par l'intermédiaire des récepteurs TLR3 (*Figure 15*).

Il a récemment été mis en avant que la chromatine peut induire la sécrétion d'immunoglobulines anti-ADN par les cellules B *via* une double interaction avec les TLR9 et des immunoglobulines M (IgM) de surface. De plus, des anticorps anti-ADN et anti-ARN sont présents chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique, laissant à penser que l'ARN pourrait donc avoir un rôle proche de celui accordé à la chromatine dans certaines maladies auto-immunes.



*Figure 15 Le blocage du signal au niveau des TLR3 inhibe l'activation des cellules dendritiques par l'ARNm ainsi que la production d'IFN- $\beta$  par les cellules HEK293 surexprimant transitoirement TLR3. D'après « mRNA is an endogenous ligand for Toll-like Receptor 3 », K. Kariko et al, 2004. Les cellules dendritiques ont été pré-incubées avec 40  $\mu$ g/ml de mAb anti-TLR3 ou avec un contrôle, pendant 30 min à 37°C, puis stimulées avec 1  $\mu$ g/ml de lipopolysaccharide (LPS), 10  $\mu$ g/ml de poly(I)-poly(C) ou 10  $\mu$ g/ml d'ARN fluoro-substitué résistant aux nucléases pendant 24h. L'expression de CD83, CD80 et CD86 des cellules a été analysée par cytométrie en flux.*

### iii. La suppression de la reconnaissance des ARN par les TLR grâce aux nucléosides modifiés

Suite à leurs travaux précédents de 2003, Karikó et Weissman se sont intéressés en 2005 à la manière dont certains ARN évitent la reconnaissance par les TLR.

Tout d'abord, l'ADN et l'ARN peuvent stimuler l'immunité innée à travers les TLR, mais pas l'ADN contenant des sites CpG méthylés. Dans les ARN, certains nucléosides sont modifiés ou méthylés, mais leur effet immunomodulateur n'avait pas été étudié jusque-là.

En effet, l'ARN est sujet à de nombreuses modifications, surtout chez les mammifères. Les ARNm bactériens ne contiennent pas de nucléosides modifiés, tandis que les ARNm de mammifères contiennent de nombreuses modifications, telles que la 5-méthylcytidine, la N6-méthyladénosine, la N7-méthylguanosine. La pseudouridine, quant à elle se retrouve dans les ARN ribosomiques ou les ARN de transfert.

Tous les ARN naturels n'activent pas les CD avec la même efficacité. Les ARN transcrits *in vitro* (IVT) les activent contrairement aux ARNm et aux acides ribonucléiques de transfert (ARNt) eucaryotes.

Pour différencier les ARN activateurs des CD, les différents ARN de mammifères ont été isolés, les ARN mitochondriaux sont ceux induisant les plus hauts taux d'IFN- $\alpha$ , ce qui s'explique par leur proximité avec les ARN bactériens. Les ARN IVT par l'ARN polymérase T7 ont eux aussi entraîné de forts taux d'IFN- $\alpha$ , contrairement aux ARNt bactériens fortement modifiés. Pour vérifier que cet effet était effectivement dû aux ARN et non à la Lipofectin® à laquelle les chercheurs les avaient complexés, de la benzonase nucléase a été utilisée pour détruire les ARN. Aucune réponse n'ayant été observée suite à cette manipulation, l'effet a été attribué aux ARN et l'activation des CD dépend de la modification de ces derniers.

La capacité des ARN modifiés à stimuler les TLR 3, 7 et 8 a été testée sur des cellules humaines en suivant la production d'IL-8 par ces cellules. Les ARN contenant des N6-méthyladénosines (m6A) ou des 2-thiouridines (s2U) n'engendrent pas de taux détectables d'IL-8. Les autres modifications post-transcriptionnelles donnent lieu à des suppressions minimales voire inexistantes de la capacité d'activation des ARN tandis que les ARN bactériens ou mitochondriaux, pauvres en modifications, activent les TLR3.

Ainsi, la présence de nucléosides modifiés au sein des ARN réduit leur capacité à induire la sécrétion de cytokines et de marqueurs d'activation par les CD, tels que CD80, CD83, CD68 ou les molécules du CMH de type II, peu importe la taille, la séquence, la présence de polyA ou de coiffe, sans pour autant impacter la capture et la stabilité des ARN.

La suppression de la stimulation immunitaire due aux ARN est proportionnelle au nombre de nucléosides modifiés qu'ils contiennent. Les chercheurs ont démontré que 3 à 6 nucléosides modifiés pour 1571 nucléosides, soit 0,2 à 0,4%, sont suffisants pour détecter une baisse de la stimulation et que 14 à 29 nucléotides modifiés, soit 1,7 à 3,2% permettent de diminuer de moitié la stimulation et 2,5% de nucléotides modifiés dans la séquence inhibent complètement la signalisation médiée par les ARN. Pour ce faire, la transcription d'ARN *in vitro* a eu lieu en présence de quantités décroissantes de nucléosides modifiés et de quantités croissantes de nucléosides non-modifiés, des études préalables

ayant prouvé que les ARN polymérases incorporent de façon égale, et donc proportionnelle à la concentration, l'un ou l'autre.

Cependant, seules les modifications touchant l'uridine, m5U, s2U ou pseudouridine, ont la capacité d'empêcher l'activation de CD dérivées du sang par l'ARN, ce qui n'est pas le cas avec les modifications de type 5-méthylcytidine (m5C) ou m6A.

Les modifications post-transcriptionnelles touchant les nucléosides sont une des pierres angulaires de la reconnaissance des ARN pathogènes par le système immunitaire. En effet, au cours de l'évolution, les bactéries ont acquis la capacité à méthyler leur ADN et ainsi de pouvoir le différencier d'un ADN exogène non-méthylé. De la même façon, dans les cellules de mammifères, les motifs CpG sont majoritairement méthylés et les ADN n'ayant pas cette caractéristique sont reconnus comme étrangers par les TLR9, entraînant une réponse immunitaire innée.

L'hypothèse avancée pour expliquer le caractère immunogène des ARN de mammifères est que ces ARN transfectés sont intériorisés dans des endosomes des cellules immunitaires et que la discrimination faite par le système immunitaire entre les ARN du soi et du non-soi se base sur la localisation cellulaire de ces ARN.

Les modifications transcriptionnelles touchant les nucléosides font partie du processus de maturation, il en existe plus de 100 différentes. La majorité de ces modifications n'apparaissent pas au hasard sur l'ARN, mais à des positions qui sont conservées entre différentes espèces. Pourtant, même les ARN les plus modifiés ne présentent pas d'altération de fonction.

La pseudouridine est la modification la plus fréquente et la plus efficace en ce qui concerne la suppression de l'activation des CD. Il en a donc été déduit que l'uridine joue un rôle majeur dans l'activation des CD. Certaines études ont notamment démontré que parmi les homopolymères des quatre nucléosides, seul celui à base d'uridine est capable d'activer les CD.[21]

#### iv. Uridine et pseudouridine

L'uridine est le nucléotide à base d'uracile, elle est substituée aux thymidines lors de la transcription de l'ADN en ARN par les ARN polymérases, mais peut s'apparier aux adénines tout comme les thymines. La pseudouridine est dérivée de l'uridine par des modifications post-transcriptionnelles. Des pseudouridines synthases sont responsables de l'isomérisation du cycle de l'uracile.

Dans l'uridine la liaison entre l'uracile et le ribose se fait entre un atome de carbone et un atome d'azote, alors que dans la pseudouridine la liaison a lieu entre deux atomes de carbone (*Figure 16*), ce qui libère

un atome d'azote qui pourra alors former une autre liaison hydrogène, permettant ainsi d'augmenter la stabilité d'un ARN.

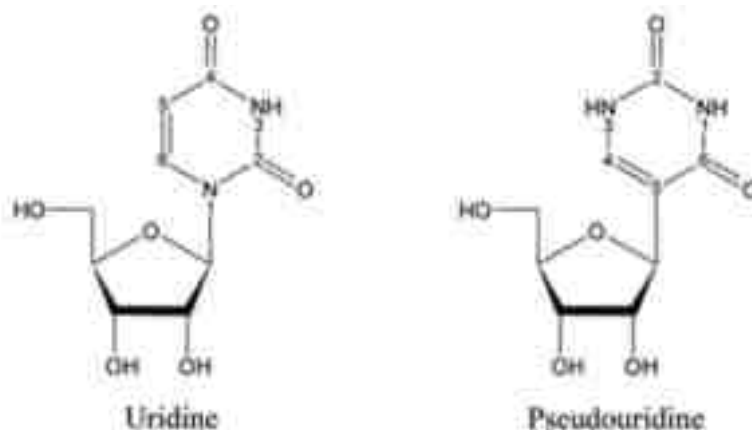


Figure 16 Uridine (à gauche) et Pseudouridine (à droite). D'après « Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry » de Jonas Mengel-Jørgensen et Finn Kirpekar, publié en 2002. Schéma montrant les différences structurales entre l'uridine et la pseudouridine

### i. L'utilisation d'ARNm pour permettre la reprogrammation de cellules et la différenciation cellulaire.

#### i. Derrick Rossi

Derrick Rossi est un biologiste canadien, spécialisé dans les cellules souches. Il a fait ses études à l'Université de Toronto au Canada ainsi qu'à l'Université d'Helsinki en Finlande.

Après avoir réalisé un post-doctorat à l'Université de Stanford aux Etats-Unis, Rossi est devenu professeur assistant dans le département de biologie régénérative et de cellules souches à l'Université d'Harvard aux Etats-Unis. En 2010, il fonde la société Moderna en se basant sur la découverte de la reprogrammation possible des cellules souches pluripotentes. En 2015, il co-fonde Intellia Therapeutics pour la recherche sur le traitement des maladies génétiques à l'aide de la technique d'édition du génome Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR). Depuis 2018, Rossi n'occupe plus de poste à l'Université d'Harvard afin de pouvoir se consacrer pleinement à ses activités entrepreneuriales[24].

#### ii. La reprogrammation hautement efficace vers la pluripotence cellulaire et la différenciation dirigée des cellules humaines grâce aux ARNm synthétiques modifiés.

C'est l'application clinique limitée des cellules souches pluripotentes induites (iPS), malgré l'espoir qu'elles représentent, qui a poussé l'équipe de D. Rossi à développer une stratégie simple et non-intégrative permettant de reprogrammer des cellules à l'aide d'ARNm. Les protocoles en vigueur jusqu'à-là ne présentaient qu'une faible efficacité et un risque potentiel en raison de la modification du génome qu'ils entraînaient[25].

La reprogrammation de cellules différenciées vers la pluripotence ouvre de nombreuses possibilités telles que l'étude du développement cellulaire normal, la modélisation personnalisée de maladies ou encore les thérapies autologues, permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de compatibilité entre le donneur et le receveur. Les premières reprogrammations ont eu recours à des vecteurs viraux pour augmenter l'expression de facteurs de transcription comme le facteur 4 « Kruppel-like » (KLF4), le proto-oncogène c-MYC, le facteur 4 de transcription liant des octamères (OCT4) et le gène codant pour le facteur 2 de transcription de la boîte SRY (SOX2) mais l'intégration virale dans le génome représentait un obstacle majeur à l'utilisation de cette technique à des fins thérapeutiques. Puis, de nouvelles techniques ont été essayées comme l'utilisation de lentivirus ou de transposons amovibles, de plasmides transitoires, du virus Sendai, d'adénovirus ou d'épisomes, c'est-à-dire de molécules d'ADN circulaires pouvant se répliquer de façon autonome ou s'intégrer dans un chromosome cellulaire, dont la transfection peut être répétée. Mais ces techniques ont aussi leurs limites. Par exemple l'utilisation du virus Sendai exige des étapes de purification particulièrement strictes pour éliminer les virus qui peuvent nuire à la viabilité cellulaire. Les méthodes mentionnées ci-dessus ayant recours à des administrations répétées sont peu efficaces en raison d'une expression faible et inconstante des facteurs de reprogrammation.

L'administration répétée d'ARNm synthétique modifié permet quant à elle la reprogrammation de cellules différenciées en cellules pluripotentes avec une efficacité supérieure à celle des vecteurs viraux, tout en étant facilement contrôlable et sans risque de mutagenèse.

Pour mener à bien ces recherches, des ARNm modifiés ont été développés par transcription *in vitro* d'amplicons de réactions en chaîne par polymérase (PCR), une coiffe a été ajoutée en 5' à l'aide d'analogues de synthèse pour augmenter l'efficacité de la traduction et la demi-vie des ARN dans le cytosol. La séquence codante a été flanquée de régions 5' et 3' UTR et d'un polyA. La complexation avec des lipides cationiques a permis la délivrance cytosolique dans les cellules de mammifères, en plus de permettre des transfections répétées pour maintenir l'expression protéique sur plusieurs jours, ce qui n'est pas le cas avec l'électroporation. Afin de réduire l'immunogénicité des ARN, des bases modifiées telles que la pseudouridine et la m<sup>5</sup>C ont été incorporées dans l'ARN et un traitement par phosphatase a permis d'enlever les produits de transcription contenant des triphosphates à leur extrémité 5', qui activent la protéine kinase R[25].

Grâce à l'utilisation de ces ARN modifiés, la transfection a été possible dans 6 types cellulaires humains différents et l'expression protéique a été détectable pendant plusieurs jours pour des ARN de haute stabilité, avec un pic d'expression 12h après la transfection. Suite à une transfection journalière avec des ARN modifiés pendant 10 jours, aucun impact sur la viabilité cellulaire et aucune altération moléculaire n'a été détectée, contrairement aux ARN non-modifiés qui ont entraîné une réponse massive médiée par les interférons ainsi qu'une baisse de la croissance et de la viabilité cellulaire.

Pour générer des iPS, des ARN codant pour les 4 facteurs de transcription cités plus haut ont été utilisés. Tous ces facteurs de transcription atteignent leur expression maximale entre 12 et 18h après la transfection, ce qui requiert donc une transfection quotidienne. Le protocole mis au point a été testé sur des fibroblastes humains dérivés de cellules souches embryonnaires, qui sont connus pour être bien reprogrammés par les vecteurs viraux. Au bout d'une semaine de transfection journalière les fibroblastes ont présenté une nouvelle morphologie compacte de type épithélioïde, puis à la deuxième semaine de transfection a eu lieu l'apparition de colonies. La transfection a été arrêtée à J17 et les cellules ont été mises en culture à J20. Toutes ces cellules présentaient un caryotype normal.

Ces cellules reprogrammées ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation à la fois fonctionnelle et moléculaire. Toutes exprimaient fortement les différents facteurs de transcription et présentaient un profil de méthylation hautement déméthylé équivalent aux cellules souches humaines embryonnaires et très différent du profil des fibroblastes de départ, tout comme leur profil d'expression génique.

De plus, leur profil moléculaire s'est avéré plus proche de celui des cellules embryonnaires que celui des cellules reprogrammées à l'aide de vecteurs viraux. Les cellules ainsi reprogrammées ont été capables de donner des cardiomyocytes contractiles, des précurseurs hématopoïétiques fonctionnels, des neurones ou encore des cellules de l'endoderme (*Figure 17*).

L'efficacité des ARN modifiés à générer des iPS est très élevée. Près de 2% des cellules ont été converties, ce qui est environ 100 fois supérieur aux techniques utilisant des vecteurs viraux et tout cela en 17 jours tandis que l'utilisation de vecteurs viraux nécessite d'attendre environ 4 semaines. La cinétique de la reprogrammation par les ARNm est donc deux fois plus rapide que la reprogrammation par le biais de vecteurs viraux.

En plus de permettre la reprogrammation cellulaire, les ARNm peuvent aussi être utilisés pour diriger la différenciation de cellules pluripotentes. La transfection de cellules pluripotentes pendant 3 jours avec des ARN codant pour la protéine MYOD, suivie de 3 jours de culture, ont permis la différenciation de ces cellules en myocytes.

L'utilisation d'ARN modifiés permet donc une reprogrammation hautement efficace ainsi qu'une différenciation cellulaire dirigée, sans risque d'intégration génomique, tout en rendant possible le contrôle temporel individuel de l'expression des facteurs de transcription. Les iPS reprogrammées à l'aide d'ARNm ont des propriétés fonctionnelles et moléculaires plus proches de celles des cellules souches embryonnaires que celles des cellules reprogrammées à l'aide de vecteurs viraux (*Figure 17*).



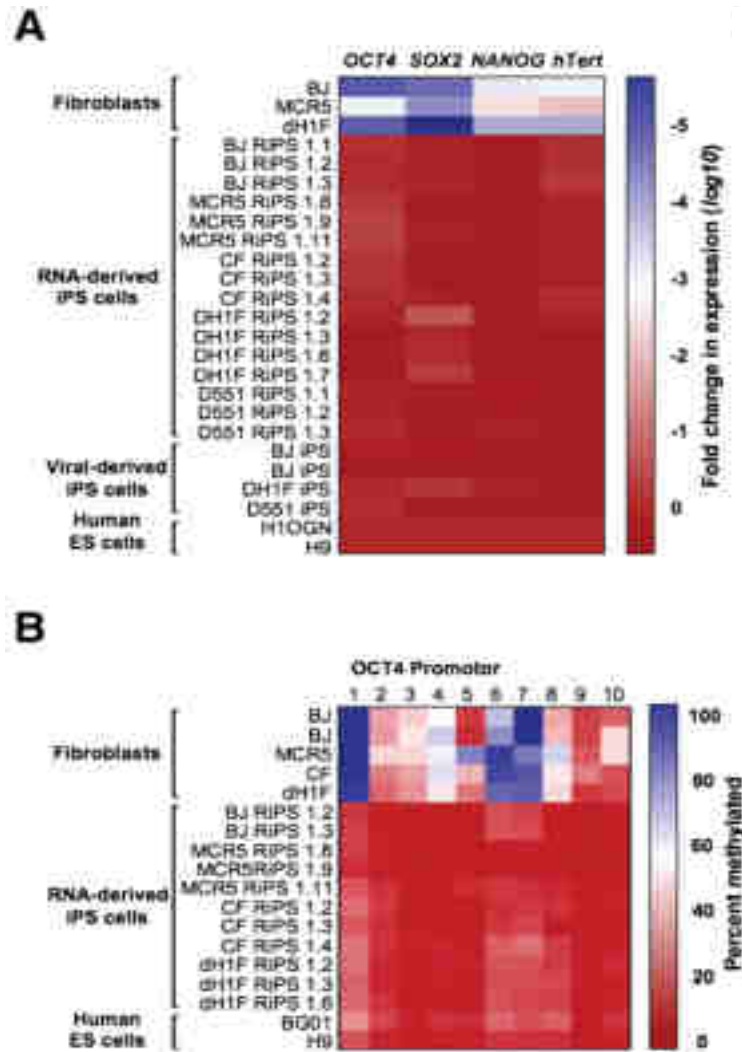


Figure 17 Caractérisation moléculaire des cellules iPS reprogrammées. D'après « Highly efficient reprogramming to pluripotency and direct differentiation of human cells using synthetic modified mRNA », Warren, Rossi et al, 2010. (A) Carte thermique des résultats de l'analyse par PCR en temps réel couplée à une transcription inverse (RT-qPCR), mesurant l'expression de gènes associés à la pluripotence dans des cellules iPS reprogrammées, dans les fibroblastes parentaux et dans des cellules iPS obtenues par technique virale, avec des cellules contrôle hES (cellules souches humaines embryonnaires). (B) Carte thermique des résultats de l'analyse de la méthylation du promoteur OCT4 dans des lignées cellulaires iPS reprogrammées, dans les fibroblastes parentaux et dans des cellules contrôle hES.

### 3. La vaccination et les vaccins

#### a. L'histoire de la vaccination

La vaccination a pour but d'éduquer et de stimuler le système immunitaire d'un individu pour le protéger d'une maladie en activant la production d'anticorps. Elle peut être préventive, afin de diminuer les risques de développer la maladie, ou thérapeutique, pour améliorer la capacité du système immunitaire à combattre une maladie déjà installée[26].

La vaccination permet de protéger les individus mais joue aussi un rôle au niveau des populations, en diminuant la propagation des maladies, voire en permettant de les éradiquer, comme dans le cas de la variole.

Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 3,5 à 5 millions de personnes seraient sauvées chaque année grâce à la vaccination[27]. Les vaccins comptent donc parmi les principaux acteurs de l'augmentation de l'espérance de la durée de vie de la population mondiale.

La variolisation, ancêtre de la vaccination, qui consiste à injecter en sous-cutané du pus prélevé dans des pustules de variole aurait été utilisée en Chine depuis le 10<sup>ème</sup> siècle (*Figure 18*). Cette technique s'est répandue en Europe au 18<sup>ème</sup> siècle grâce à Lady Montagu. Dans les années qui suivirent Francis Homes réalisa des travaux portant sur l'inoculation de la rougeole chez l'Homme et l'anglais Benjamin Jesty réalisa que des laitiers ayant été atteints par la vaccine, une forme de variole touchant les vaches et les chevaux, étaient protégés contre la variole. Ce dernier inocula la vaccine aux membres de sa famille, réalisant ainsi la première vaccination de l'histoire en 1774. Cette théorie fut étouffée en 1796 par Edward Jenner, qui publia ces travaux en 1798.[28], [29], [30]

Au 19<sup>ème</sup> siècle, Louis Pasteur concentre d'abord ses efforts sur la vaccination animale. Il met au point différentes techniques d'atténuation des virus afin de permettre leur utilisation en vaccination. Ses travaux portent d'abord sur le choléra des poules, contre lequel il développera un vaccin en 1878, puis sur l'anthrax dont le vaccin sera opérationnel en 1881. Ces vaccins ont été développés en utilisant l'oxygénation et l'exposition à la chaleur comme méthodes d'atténuation.

À partir de 1880, Pasteur décide d'appliquer ses méthodes d'atténuation au virus de la rage. Il va ainsi exposer des moelles de lapins enragés à l'air avant de les injecter à des chiens pour les immuniser. La première utilisation du vaccin antirabique a lieu en 1885.[29];[31], [32]

Le 20<sup>ème</sup> siècle a vu l'avènement de la vaccination avec la mise au point du BCG (Bacille Calmette et Guérin) par Calmette et Guérin en 1921. Pour atténuer la pathogénicité du bacille, Calmette et Guérin ont eu recours à la culture en cascade, toutes les 3 semaines les colonies étaient repiquées dans un nouveau milieu à base de bile de bœuf, de glycérine et de pomme de terre jusqu'à atteindre 230 passages.[32], [33], [34]

En 1932, les scientifiques J. Laigret et A.W. Sellards de l'Institut Pasteur créent un premier vaccin contre la fièvre jaune en atténuant le virus grâce à des passages successifs sur des tissus cérébraux d'embryons de souris. Ce vaccin sera ensuite amélioré par M. Theiler et H.H. Smith en 1936, ceux-ci ont recours à des tissus embryonnaires de poulet qui ont l'avantage de ne pas entraîner d'encéphalite post-vaccinale contrairement à la première version du vaccin.[32], [35], [36]

Le premier vaccin contre la grippe est autorisé en 1945 pour usage militaire avant d'être ouvert à la population civile l'année suivante. T. Francis et J. Salk obtiennent ce vaccin par culture dans des œufs de poule, suivie d'une inactivation chimique.[37], [38]

Jonas Salk développe ensuite le premier vaccin contre la poliomyélite en 1955. Pour cela il utilise du formaldéhyde pour tuer le virus sans diminuer ses propriétés antigéniques. Ce succès sera cependant



des surfactants, des stabilisateurs, des émulsifiants et des substances résiduelles des différentes étapes de production du vaccin [26], [43].

Les conservateurs ont pour but d'éviter la prolifération de champignons ou de bactéries. Les stabilisateurs servent à éviter que les antigènes soient dégradés ou qu'ils ne se collent au contenant. Le thiomersal ou thimerosal, dérivé du mercure, est utilisé en faible quantité dans les vaccins produits sous forme de flacons multidoses, il a cependant été retiré des vaccins en Europe, au Royaume-Uni et aux Etats-Unis par mesure de précaution dans le but de réduire l'exposition au mercure, bien qu'il n'y ait aucune preuve d'un effet toxique de ce composant. Le phénol est aussi utilisé en tant que conservateur, notamment dans les vaccins Pneumovax 23 et Typhim Vi[44]. Le 2-Phenoxyethanol est utilisé dans le vaccin Ipol contre la polio et le chlorure de benzéthonium dans le vaccin BioThrax contre *Bacillus anthracis*[44].

Les adjuvants, tels que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium et l'alun de potassium, le CpG 1018 à base de cytosines et de guanines présent dans le vaccin contre la maladie du corona virus 19 (COVID-19) de Valneva et le lipide monophosphoryl A dans le vaccin Cervarix du laboratoire GSK, sont utilisés pour augmenter la réponse immunitaire de l'hôte suite à la vaccination[45] et permettent ainsi de diminuer la quantité d'antigène injectée, ainsi que le nombre d'injections.

Les surfactants, les stabilisateurs et les émulsifiants ont pour but d'assurer un mélange homogène des différents composants. Parmi eux, se trouvent le sucrose, le lactose, le mannitol, le glycérol, l'urée, le polysorbate 80, le glutamate monosodique, la gélatine et l'hydrochloride d'arginine[46].

Ils peuvent être monovalents ou multi/polyvalents, ce qui signifie qu'ils développent l'immunité des patients contre un seul sous-type de l'agent pathogène ou contre plusieurs sous-types d'un même pathogène (Prevenar 13® ou Pneumovax pour l'immunisation contre plusieurs sous-types de pneumocoques)[26].

Les vaccins peuvent aussi être combinés ou associés, dans ce cas un seul vaccin va permettre d'immuniser le patient contre plusieurs pathogènes différents. Par exemple, le ROR permet de lutter contre la rougeole, les oreillons et la rubéole[26]. Différentes techniques de vaccination existent, parmi elles on retrouve des techniques plus classiques comme l'injection directe d'antigènes protéiques ou encore les vaccins à ARNm, dernière technique à avoir fait son apparition sur le marché.

## ii. Principes immunologiques de la vaccination

La vaccination a pour but d'induire une mémoire immunitaire de l'hôte contre le pathogène. Celle-ci est obtenue grâce à l'interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les macrophages, les DC et les lymphocytes B, présentent l'antigène à leur surface *via* le CMH de classe II. Cet antigène va être reconnu par les LTCD4 qui vont se différencier en lymphocytes T helpers 1 (LTh) ou 2. Si les CPA sécrètent de l'IL-12 ils se différencieront en LTh1 qui

sécréteront des cytokines qui activeront une réponse cellulaire à l'aide des macrophages et des LTCD8, qui reconnaissent les antigènes présentés par le CMH de classe I et détruisent les cellules infectées. Tous les types de vaccins n'induisent pas la même induction des LTCD8, par exemple les vaccins vivants atténués sont de puissants inducteurs puisqu'ils entraînent l'infection des cellules par le virus.

Les LTCD4 se différencieront en LTh2 si les CPA sécrètent de l'IL-10, ce qui entrainera une réponse humorale avec l'activation des lymphocytes B (LB) et la production d'anticorps. L'affinité des anticorps ainsi produits est d'abord faible mais elle augmente grâce à la commutation isotypique. En cas de deuxième contact avec l'antigène, ce sont les LB mémoire qui seront activés, ce qui va permettre directement la production d'anticorps de haute affinité en grande quantité. Ces anticorps peuvent directement reconnaître les pathogènes sans l'aide de CPA, ils permettent donc de combattre l'infection avant que les pathogènes ne se soient fixés ou n'aient pénétré dans les cellules. Les anticorps jouent aussi d'autres rôles *via* leur région constante, tels que l'opsonisation qui facilite la phagocytose, l'activation du complément pour lyser les bactéries et l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.[29]

### iii. Vaccins prophylactiques et thérapeutiques

La grande majorité des vaccins sont utilisés dans un but prophylactique, en préparant l'organisme à se défendre en cas d'une potentielle rencontre avec un pathogène. Cependant les vaccins thérapeutiques constituent un axe de recherche important dans le traitement de cancers et d'infections chroniques.

Plusieurs approches sont étudiées pour l'apport de l'antigène dans ces vaccins, l'utilisation d'un peptide ou d'une protéine, l'apport de CPA présentant déjà les antigènes, l'expression de l'antigène par l'hôte en inoculant l'ADN ou l'ARN correspondant, la lyse de cellules tumorales de l'hôte à l'aide de virus oncolytiques permettant ainsi de rendre les antigènes tumoraux plus accessibles pour les acteurs de l'immunité.[47]

Différentes approches sont étudiées dans le cadre des vaccins thérapeutiques, l'une d'elles consiste à mettre au point un vaccin dont l'antigène est une protéine qui contient les domaines ED-A et ED-b de la fibronectine, qui est exprimée par les cellules vasculaires. Le vaccin est donc dirigé contre le système vasculaire tumoral, le but étant de limiter l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules cancéreuses. Les premiers résultats ont montré une diminution de la taille tumorale chez des souris et une diminution du nombre de métastases.[48]

Plus de 85% des cancers expriment fortement la télomérase, conférant ainsi un caractère immortel aux cellules cancéreuses. C'est pourquoi cette enzyme est une cible de choix dans l'élaboration de vaccins anti-cancéreux. Des vaccins peptidiques dirigés contre la télomérase sont actuellement à l'étude, tels que GV1001 contenant un peptide antigénique de la sous-unité catalytique de la télomérase appelée transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT), ou UV1 combinant trois peptides différents

dérivés de hTERT, ou encore UCPVax. Le but de ces vaccins est d'induire une réponse immunitaire *via* les LTCD4[49], [50], [51]. D'autres pistes étudiées sont l'utilisation de CD transfectées avec l'ARNm correspondant au domaine hTERT, un vaccin à ADN recombinant qui code pour un peptide dérivé du domaine INVAC-1.[52]

Des vaccins thérapeutiques sont aussi à l'essai dans le cadre de la prise en charge du cancer du col de l'utérus, tels que VGX-3100 qui contient deux plasmides codant pour les protéines oncogènes E6 et E7 des papillomavirus humains (HPV) 16 et 18, le vaccin à ADN MEDI0457 dirigé contre les mêmes protéines, ou des vaccins vivants recombinés utilisant le virus de la paravaccin des bovins ou celui de la vaccine comme vecteur viral (vaccin MVA E2) codant pour l'antigène E2 du papillomavirus bovin.[47], [53], [54], [55], [56], [57]

Le vaccin Melacine® de la firme Corixa Corp's therapeutic est quant à lui autorisé au Canada depuis 1999 dans le cadre du traitement des mélanomes. Il s'agit d'un lysat de cellules provenant de deux lignées cellulaires de mélanomes humains. Bien qu'aucune augmentation significative de la survie des patients n'ait été démontrée, ce vaccin a été autorisé en raison de la nette amélioration de la qualité de vie qu'il offrait aux patients comparé à ceux traités par chimiothérapie.[58], [59]

Les vaccins thérapeutiques font aussi l'objet de recherches dans le domaine des maladies neurodégénératives comme le prouve le cas notamment du Copolymer-1 (acétate de glatiramère) dans le cadre de la sclérose en plaques rémittente-récurrente.[60], [61]

### **c. Le développement d'un vaccin**

#### **i. La recherche préclinique**

Avant de tester un vaccin sur l'Homme, celui-ci fait l'objet d'études précliniques, notamment pour déterminer quel antigène permet de déclencher une réponse immunitaire[43]. Durant cette phase le produit est testé *in vitro*, sur des cellules en culture, et *in vivo*, chez l'animal. Pour ce qui est des tests *in vivo*, ils doivent être réalisés sur trois espèces différentes, dont un rongeur. Cette phase permet d'obtenir des données toxicologiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques sur le médicament, comme sa toxicité, son mécanisme d'action, sa diffusion dans l'organisme, son métabolisme avec les différentes transformations subies par la molécule dans l'organisme ainsi que son élimination. La toxicité évaluée au cours de cette phase concerne bien évidemment l'animal lui-même, mais aussi les potentiels effets que la molécule pourrait avoir sur la descendance de ce dernier. L'évaluation de la toxicité de la molécule et la dose sans effet toxique sur l'animal permettent de déterminer la dose à utiliser chez l'Homme[62]. Si les données obtenues lors de la phase préclinique le permettent l'évaluation clinique chez l'Homme pourra commencer. Celle-ci se décompose en quatre phases.

## ii. La phase I

Cette première phase clinique chez l'Homme est réalisée sur une vingtaine de sujets. Ces sujets sont en règle générale sains, sauf dans le cas de traitements particulièrement agressifs. Au cours de cette phase, le but est de déterminer la cinétique de la molécule dans l'organisme, son immunogénicité, ainsi que sa toxicité chez l'Homme en administrant différentes doses aux sujets[62], [63], [64].

## iii. La phase II

Cette phase est réalisée sur des sujets malades et a pour but de mettre en avant l'effet de la molécule sur la pathologie, ses effets indésirables et de déterminer la dose minimale efficace. Elle se divise en deux phases, tout d'abord la phase IIa qui a pour but d'évaluer l'efficacité de la molécule, en termes de prévention de la pathologie quand il s'agit d'un vaccin, sur un nombre restreint de volontaires, puis la phase IIb qui quant à elle vise à déterminer la dose à utiliser de la molécule, en se basant sur un nombre de volontaires légèrement supérieur, généralement entre 100 et 300 sur lesquels différentes doses seront testées[62], [63], [64].

## iv. La phase III

Cette phase est la dernière avant la mise sur le marché du médicament. Elle est effectuée sur des sujets malades, le nombre de sujets varie en fonction de la gravité de la maladie mais aussi en fonction de sa prévalence dans la population générale, cela peut aller de quelques centaines de sujets à plusieurs milliers. Elle dure généralement plusieurs années. Il s'agit de comparer l'efficacité du médicament en développement avec un médicament déjà commercialisé ou un placebo. Dans le cas d'un vaccin prophylactique, l'efficacité absolue du candidat vaccin va être comparée à un placebo, mais si un autre vaccin prophylactique existe déjà contre la maladie ciblée, son efficacité sera comparée à celle du candidat vaccin pour déterminer l'efficacité relative de celui-ci. C'est aussi lors de cette phase que sont menés des essais concernant le mode d'administration du médicament, ainsi que l'étude de son conditionnement. Ce processus est généralement réalisé en double aveugle. Le nombre limité de patients inclus dans cette phase ne permet pas d'avoir une connaissance complète du produit, c'est pour ça que l'évaluation de celui-ci se poursuit après cette phase bien qu'elle soit la dernière avant la mise sur le marché [62], [63], [64].

## v. La phase IV

La phase IV a lieu après la mise sur le marché du médicament et a pour but de permettre de suivre les effets à long terme et à grande échelle de la molécule et de détecter des effets indésirables ne pouvant être observés que sur de grandes populations. En effet, les étapes précédentes ne permettent généralement que de déceler des effets indésirables survenant chez au moins 1 personne sur 1 000 alors

que le suivi post-commercialisation permet quant à lui de déceler des effets indésirables se manifestant chez 1 personne sur 10 000 ou moins. La phase IV peut aussi permettre d'affiner les conditions d'utilisation du nouveau vaccin, notamment pour certains groupes de patients tels que les personnes âgées, les enfants, les patients souffrants d'autres maladies. Dans le cas d'un vaccin prophylactique, c'est durant cette phase que l'on peut réellement mesurer l'impact épidémiologique du vaccin, *via* des taux d'incidence et de mortalité de la maladie ciblée [62], [64].

#### vi. Le challenge infectieux

Le challenge infectieux consiste à infecter un sujet sain avec un pathogène pour pouvoir étudier les effets de ce dernier. Cette pratique permet de mieux caractériser le pathogène et la maladie qu'il induit en termes de symptômes, de cinétique, d'expression virale et de transmissibilité, mais aussi d'améliorer la compréhension de la pathogénèse et de l'immunité entraînée par ce pathogène, d'identifier des corrélats d'immunités (qui correspondent à des marqueurs mesurables indiquant qu'une personne est immunisée contre un pathogène[65]), d'optimiser la conception d'essais cliniques traditionnels en définissant mieux les points de terminaisons. Le challenge infectieux peut aussi servir de preuve de concept pour un candidat vaccin, ou à sélectionner des candidats et ainsi à diminuer le risque d'échec lors du développement de vaccins, à comparer l'efficacité du vaccin entre des conditions endémiques et une population d'essai clinique. Cette pratique peut aussi être utilisée afin de valider l'utilisation en urgence d'un vaccin expérimental.

Le cadre juridique du challenge infectieux varie d'un pays à l'autre. L'OMS a cependant émis des directives afin de permettre une certaine harmonisation de cette pratique au niveau mondial.

Le challenge infectieux peut être réalisé dans le cadre d'une maladie pouvant être détectée rapidement, aisément et de manière objective, pour laquelle des traitements disponibles sont efficaces dans la prévention de la morbidité et la diminution de la mortalité. Bien que la sécurité du pathogène injectée ne puisse pas être garantie complètement, sa qualité doit être identique à celle d'un vaccin.

Cette pratique ne doit pas être utilisée dans le cas d'un pathogène à taux élevé de mortalité ou en l'absence de traitements permettant de prévenir ou de diminuer la sévérité de la maladie et d'exclure la mortalité[66].

L'étude de l'Université d'Oxford, COV-CHIM 01[67] commencée en avril 2021, est un exemple de ce challenge infectieux. Elle a pour but de développer un modèle infectieux humain sûr afin d'améliorer les connaissances actuelles sur la protection induite par une infection à la COVID-19 ou par la vaccination. La première phase de cette étude a pour but de déterminer la plus faible dose de virus suffisant à induire une répllication virale avec peu ou pas de symptômes chez 50% de sujets ayant déjà été infectés par la COVID-19 ou ayant été vaccinés contre cette dernière.



Une fois cette dose déterminée, elle sera utilisée dans la deuxième phase de l'étude pour contaminer des sujets sains afin d'étudier leur réaction immunitaire[68].

Les critères d'éligibilité pour les participants de cette étude sont les suivants : être âgé de 18 à 30 ans, être en excellente santé, être prêt à se déplacer à Oxford, avoir été infecté par le SRAS-CoV-2 (et être vacciné ou non contre la COVID-19) ou ne pas avoir été infecté mais être vacciné, ne pas fumer, ne pas vapoter, ne pas être enceinte, ne pas allaiter.

La souche de virus utilisée lors de cette étude est la souche originale du SRAS-CoV-2 provenant de Wuhan. La durée de l'étude est de 12 mois, elle se compose d'une phase d'hospitalisation de 17 jours minimum avec une quarantaine d'au moins 14 jours et des scanners pulmonaires ainsi que des IRM cérébrales, suivi d'au minimum 5 rendez-vous de suivi après la fin de l'hospitalisation.

Pour cette étude il est prévu de recruter 112 participants, qui seront ensuite répartis en quatre groupes. Le premier groupe visant à déterminer la dose de virus nécessaire chez des participants ayant déjà été infectés, en testant chaque dose sur 4 à 8 participants. Le deuxième groupe permettra de confirmer la dose retenue en cas d'infection préalable en infectant 20 participants (10 participants supplémentaires pouvant être ajoutés à ce groupe si besoin). Le troisième groupe a pour but de déterminer la dose de virus nécessaire chez des participants non-infectés mais vaccinés, en testant chaque dose sur 4 à 8 participants. Le deuxième groupe permettra de confirmer la dose retenue en cas de vaccination en infectant 20 participants (10 participants supplémentaires pouvant être ajoutés à ce groupe si besoin).

#### 4. Les différents types de vaccins utilisés

Il existe différents types de vaccins n'utilisant pas les mêmes méthodes pour obtenir l'immunité souhaitée. Ces différents vaccins présentent chacun des avantages et des inconvénients qui régissent leur utilisation, autant pour la détermination des patients cibles que pour celle des pathogènes contre lesquels ils seront utilisés (*Figure 19*).












Type of vaccine		Licensed vaccines using this technology	First introduced:
Live attenuated (weakened or inactivated)		Measles, mumps, rubella, yellow fever, influenza, oral polio, typhoid, Japanese encephalitis, rotavirus, BCG, varicella zoster.	1798 (smallpox)
Killed whole organism		Whole-cell pertussis, polio, influenza, Japanese encephalitis, hepatitis A, rabies	1895 (typhoid)
Toxoid		Diphtheria, tetanus	1923 (diphtheria)
Subunit (purified protein, recombinant protein, polysaccharide, peptide)		Pertussis, influenza, hepatitis B, meningococcal, pneumococcal, typhoid, hepatitis A	1970 (anthrax)
Virus-like particle		Human papillomavirus	1986 (hepatitis B)
Outer membrane vesicle		Group B meningococcal	1987 (group B meningococcal)
Protein-polysaccharide conjugate		Haemophilus influenzae type B, pneumococcal, meningococcal, typhoid	1987 (H. influenzae type b)
Viral vectored		Ebola	2019 (Ebola)
Nucleic acid vaccine		SARS-CoV-2	2020 (SARS-CoV-2)
Bacterial vectored		Experimental	-
Antigen-presenting cell		Experimental	-

Figure 19 Les différents types de vaccins, « A Guide to vaccinology : from basic principles to new developments », A. J. Pollard, E. M. Bijker, Immunology, Février 2021. Tableau récapitulant les différents types de vaccins, indiquant contre quels pathogènes chaque type de vaccin est utilisé et quand et contre quoi chaque type de vaccin a été utilisé pour la première fois.

### a. Les vaccins à pathogènes entiers

#### i. Les vaccins vivants atténués

Les vaccins tels que le ROR, commercialisé en France sous les noms de Priorix®[69] (contenant les virus vivants atténués des oreillons souche Jeryl Lynn, de la rubéole souche Wistar RA 27/3 M et de la

rougeole souche Schwarz) et M-M-RVaxpro®[70] (contenant les virus vivants atténués des oreillons souche Jeryl Lynn, de la rougeole souche Edmonston Enders et de la rubéole souche Wistar RA 27/3 M), et le BCG contre la tuberculose, commercialisé sous le nom de BCG Ajvaccines®[71] (contenant des BCG vivants atténués souche danoise 1331) par le Centre des Spécialités pharmaceutiques, appartiennent à cette catégorie. La première utilisation connue de ce type de vaccins remonte à 1798 pour lutter contre la variole[72]. Ils reposent sur l'utilisation d'agents infectieux entiers dont la virulence a été réduite par culture ou mutation chez une autre espèce[73]. Cette atténuation peut être faite sur des cellules de culture ou d'embryons de poulet. Dans ce cas-là, la capacité du virus à se répliquer dans des cellules de poulet augmente à chaque passage tandis que sa capacité à se répliquer dans des cellules humaines diminue.

La réponse immunitaire qu'ils entraînent est excellente et presque aussi efficace que celle déclenchée par l'infection elle-même. De plus, ce type de vaccin provoque une stimulation antigénique continue et donc assez longue pour induire la production de cellules mémoires de l'immunité. A cela s'ajoute la capacité d'un agent pathogène, même atténué, à se répliquer dans les cellules hôtes et donc à stimuler la médiation cellulaire.

Néanmoins, ces vaccins sont aussi ceux qui comportent le plus de risques, notamment d'induire la maladie et ceci est d'autant plus vrai chez des patients immunodéprimés. C'est pourquoi ce type de vaccin n'est pas adapté à toute la population et ne peut pas être envisagé pour tous les virus, en particulier les plus dangereux, tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

## ii. Les vaccins inactivés

Contrairement aux vaccins vivants atténués, les vaccins à base de pathogènes (virus, bactéries) inactivés ne peuvent pas provoquer la maladie contre laquelle ils sont censés lutter. Ils sont composés d'agents infectieux entiers ne pouvant plus se multiplier suite à un traitement chimique ou physique. La chaleur ou le formaldéhyde font partie des traitements les plus utilisés. Ces traitements ont l'avantage de ne pas attaquer la structure du pathogène, qui sera ainsi toujours reconnu par le système immunitaire. Les pathogènes inactivés ont aussi l'avantage d'être plus stables, mais dans certains cas ils n'induisent pas de réponse immunitaire ou alors la réaction peut être de courte durée, ce qui explique que plusieurs injections sont souvent nécessaires. Parmi les vaccins inactivés[74] se trouvent les vaccins contre la poliomyélite comme Boostrixtetra®[75] de GlaxoSmithKline qui contient le virus poliomyélitique inactivé de type 2, les vaccins contre la rage comme le Vaccin rabique Pasteur®[76] de Sanofi Pasteur à base de virus rabique inactivé souche Wistar Rabies PM/WI 38-1503-3 M ou Rabipur®[77] de Valneva contenant le virus rabique inactivé souche Flury LEP et le vaccin contre l'hépatite A de Sanofi Pasteur, Avaxim®[78]. Ce type de vaccin avait également été utilisé depuis 1896 contre la fièvre typhoïde[72]

## b. Les vaccins sous-unitaires

Ils sont composés uniquement de fragments spécifiques de l'agent pathogène et non d'agents pathogènes entiers. Leur coût de production est supérieur à celui de leurs concurrents en raison des études qui doivent être menées au préalable pour déterminer la sous-unité du pathogène qui induira la meilleure réponse immunitaire. Ces vaccins sont considérés comme très sûrs, tout comme les vaccins inactivés car ils ne contiennent pas de pathogènes vivants, mais la création de cellules mémoires du système immunitaire n'est pas garantie.

La nature de la sous-unité choisie du pathogène peut varier[79]. Les vaccins contre la fièvre typhoïde, tels que le Typhim VI®[80], à base de salmonella typhi polyside Vi souche Ty2, et Tyavax®[81] de Sanofi Pasteur, contenant du salmonella typhi polyside capsulaire Vi souche Ty2, utilisent des sous-unités de la bactérie *Salmonella typhi*.

### i. Les vaccins à anatoxines

Dans ces vaccins la toxine du pathogène est utilisée comme un antigène pour induire une immunité après avoir été inactivée par du formaldéhyde. Des adjuvants tels que les sels de calcium ou d'aluminium sont souvent utilisés pour adsorber la toxine afin d'augmenter la réponse immunitaire et contrecarrer leur faible immunogénicité. Des injections multiples sont souvent requises pour atteindre une efficacité correcte[82]. Ce type de vaccin n'est utilisable que pour contrer des maladies qui ne sont pas causées directement par les bactéries mais par des toxines produites par ces bactéries.

Ces vaccins sont considérés comme sûrs car les toxines ne peuvent pas redevenir virulentes et ne risquent donc pas d'induire la maladie. Les vaccins contre la diphtérie et le tétanos utilisent des anatoxines (depuis 1923 dans le cas du vaccin anti-diphtérique)[72]. Le vaccin Repevax®[83] de Sanofi Pasteur contient entre autres des anatoxines diphtériques, tétaniques et pertussiques.

### ii. Les vaccins sous-unitaires à base de protéines (protéines purifiées et protéines recombinantes)

Ce type de vaccin est composé d'une protéine spécifique de l'agent pathogène. Un des problèmes majeurs de ce type de vaccins est que les protéines ainsi isolées peuvent être dénaturées, c'est-à-dire perdre la conformation qu'elles ont lorsqu'elles sont incluses dans l'ensemble qui forme le pathogène. Ce changement de conformation peut induire des liaisons à des anticorps différents que ceux auxquels le pathogène entier se lie. Deux exemples de ce type de vaccins sont les vaccins contre le méningocoque B et contre le papillomavirus. Dans le cas du vaccin Trumenba®[84] de Pfizer contre le méningocoque B, les lipoprotéines de liaison au facteur H (fHbp) des sous-familles A et B sont produites dans des cellules d'*Escherichia coli* à l'aide d'un ADN recombinant et adsorbées sur du phosphate d'aluminium. Le vaccin Cervarix® de GlaxoSmithKline (GSK) Vaccines utilise les protéines L1 de Papillomavirus

Humain de type 16 et 18 produites à l'aide de cellules Hi-5 Rix4446 dérivées de *Trichoplusia ni*, de Baculovirus et d'ADN recombinant avant d'être adsorbées sur de l'hydroxyde d'aluminium hydraté[85].

### iii. Les vaccins sous-unitaires polysaccharidiques

Avec ce type de vaccins, c'est la capsule polysaccharidique, qui entoure certaines bactéries et qui leur permet normalement d'échapper au système immunitaire, qui est visée par la réponse immunitaire attendue[82]. Cependant, ces vaccins peuvent ne pas être efficaces chez les enfants de moins de 25 mois ou induire une immunité à court terme seulement, en raison de la petite taille des molécules qui les composent et de leur faible immunogénicité. En effet, chez les adultes ces vaccins vont entraîner une réponse T-indépendante mais les enfants n'ont pas de réponse T-indépendante efficace. Les vaccins anti-méningococciques (Neisvac® de Pfizer) et anti-pneumococciques (Pneumovax® de MSD et Prevenar 13® de Pfizer) appartiennent à cette famille de vaccins.

### iv. Les vaccins sous-unitaires conjugués

Ils visent eux aussi les molécules de la capsule du pathogène, mais dans ce cas le polysaccharide est lié à une protéine porteuse qui est capable d'induire une réponse à long terme même chez les nourrissons[86]. Le but de ces vaccins est de relier le polysaccharide à des antigènes contre lesquels le système immunitaire réagit fortement afin d'entraîner ce dernier à réagir aussi face au polysaccharide. Il existe différents types de protéines porteuses, telles que les anatoxines (tétaniques et diphtériques). Le vaccin contre l'*Haemophilus influenzae* de type b ACT-HIB®[87] de Sanofi Pasteur, contenant un polysaccharide d'*Haemophilus influenzae* type b conjugué à la protéine tétanique est un exemple de ce type de vaccins.

## c. Les vaccins vectorisés

Dans le cas des vaccins vectorisés, des virus ou des bactéries vivants mais atténués et génétiquement modifiés afin d'exprimer des antigènes hétérologues, c'est-à-dire propres à un autre pathogène, permettent la délivrance des antigènes dans l'organisme. Pour ce faire des pathogènes ne pouvant pas ou très peu se multiplier sont choisis comme vecteurs, ainsi ils ne peuvent pas infecter le patient.

### i. Les vaccins à vecteur viral

C'est notamment le cas des vaccins contre la COVID-19 des laboratoires AstraZeneca et Johnson&Johnson. Ceux-ci utilisent des adénovirus comme vecteurs viraux.

Les adénovirus sont des virus non-enveloppés qui possèdent un ADN bicaténaire, ils ont l'avantage d'avoir un tropisme large.

Le vaccin JCOVDEN® de Johnson&Johnson fait appel à un adénovirus humain de type 26 inactivé recombinant et non-répliquatif codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2[88], [89].

Le vaccin Vaxzevria® d'AstraZeneca utilise lui un adénovirus de chimpanzé recombinant non-répliquatif exprimant la protéine Spike[90], [91].

Le vaccin Ervebo® des laboratoires MSD est le premier à avoir été approuvé en 2019[72]. Il utilise quant à lui un virus vivant atténué capable de se répliquer, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV)[92]. Dans ce vaccin, le VSV est recombinant car le gène codant pour sa protéine G a été remplacé par celui codant pour la glycoprotéine de surface du virus Ebola Zaïre[93].

Ces vaccins ne contenant qu'une partie du génome du pathogène ne présentent donc pas de risque de développer la maladie.

## ii. Les vaccins à vecteur bactérien

Les vaccins à vecteurs bactériens sont pour le moment encore en phase de tests[72]. Cependant les bactéries les plus étudiées comme possibles vecteurs sont le BCG préparé à partir du bacille tuberculeux bovin *Mycobacterium bovis*, les listeria qui sont des bacilles gram positifs très résistants et dont une seule espèce est pathogène pour l'Homme, *Listeria monocytogenes* donnant lieu à des listérioses, ainsi que deux types d'entérobactéries, les shigelles responsables de la dysenterie bacillaire, les salmonelles causant des fièvres (para)typhoïdes et des salmonelloses, *Lactococcus lactis* et certaines souches des *Lactobacillus*[94].

Les vaccins à vecteur bactérien à l'étude sont majoritairement dirigés contre les pathogènes suivants : *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, HPV16, HIV, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylory*, *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis* et *Listeria monocytogenes*[94].

L'intérêt des vecteurs bactériens repose notamment sur leur tropisme naturel pour les CPA, ce qui permet la stimulation du système immunitaire *via* la présentation de l'antigène, et sur la possibilité d'une administration par voie muqueuse qui stimule à la fois les réponses immunitaires locales et systémiques tandis que les voies d'administration classiques stimulent majoritairement l'immunité systémique. Un certain nombre de points liés à l'utilisation de microorganismes génétiquement modifiés vivants restent cependant à approfondir avant d'espérer une utilisation à grande échelle de cette technique, notamment le risque de contamination de l'environnement par ces organismes, celui d'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques ou de réversion de l'atténuation vers une forme virulente[94].

## d. Les vaccins à particules pseudo-virales

Ces vaccins sont basés sur l'utilisation d'enveloppes virales ne contenant pas de génome. Leurs avantages sont l'absence de risque infectieux ainsi que le fait d'entraîner le système immunitaire à reconnaître un virus identique au virus sauvage du point de vue de son enveloppe[95]. Cependant leur production est lourde et coûteuse.

Le vaccin Covifenz® du laboratoire Medicago, qui est commercialisé au Canada appartient à cette catégorie de vaccins[96]. Ce dernier contient des protéines Spike qui s'assemblent en particules pseudo-virales, ces particules imitent ainsi la structure du SRAS-CoV-2. Ces particules pseudo-virales sont produites par des plantes auxquelles la séquence codant pour la protéine Spike a été transmise par des bactéries[97], [98].

#### **e. Les vaccins à cellules présentatrices d'antigènes**

Comme vu précédemment, les CD, permettant l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'antigène cible, sont la cible de différentes stratégies visant à optimiser leur mise en relation avec les antigènes d'intérêt, aussi bien *in vivo*, qu'*ex vivo*.

La première approche utilisée a été de prélever des CPA chez le patient, de les mettre en présence de peptides tumoraux et d'induire leur maturation, avant de les réinjecter au patient. C'est notamment le principe utilisé pour le vaccin Provenge® (Sipuleucel-T) qui a été le premier à obtenir une AMM pour le traitement du cancer de la prostate, avant d'être retiré du marché en 2015 suite à la faillite de son fabricant. Les CD du patient étaient prélevées par leucaphérèse, puis envoyées chez le fabricant pour être activées par des protéines PA2024 obtenues en fusionnant un facteur de croissance de la lignée granulocytaire et monocyttaire, le GM-CSF, et des phosphatases acides prostatiques. Ces CD sont ensuite renvoyées pour être réinjectées au patient. Ce vaccin permettait d'augmenter la survie globale des patients d'environ 4 mois. [99], [100], [101], [102]

La faible quantité de CD dans le sang périphérique a orienté les recherches vers une nouvelle génération de vaccins visant à différencier des monocytes en CD-like. Cette technique se base sur le fait qu'il y a 10 fois plus de monocytes que de CD dans le sang périphériques. Les cellules CD14+ sont séparées des autres soit en utilisant leur capacité à adhérer au plastique, soit en ayant recours à des billes anti-CD14 et à une séparation magnétique. Elles sont ensuite mise en culture en présence de cytokines pendant 4-5 jours. À ce stade elles présentent un phénotype de type CD et peuvent être activées comme précédemment.[101]

*Ex vivo*, l'activation des CPA peut se faire en utilisant des peptides ou des protéines, des cellules tumorales apoptotiques, du lysat de cellules tumorales ou des ARNm codant pour des antigènes préalablement identifiés que les cellules traduiront en protéines. La transfection peut se faire par électroporation, en utilisant des liposomes comme vecteurs ou par transfection passive, cependant cette dernière méthode s'est avérée moins efficace que les deux autres[103].

Les voies d'administration de ce type de vaccins sont nombreuses, dont les voies sous-cutanée, intradermale, intraveineuse, intralymphatique ou intranodale.[101]

*In vivo*, les CD peuvent être ciblées en couplant l'antigène d'intérêt à un anticorps dirigé contre des molécules de la surface cellulaire uniquement présentes chez les CD. Des études ont été réalisées chez

les souris en couplant l'antigène OVA avec un anticorps de rat anti-souris DEC-205 et ont montré une efficacité 10 fois supérieure dans la présentation de l'antigène par les CD aux LT CD4/8+[101], [104]. Des systèmes de co-délivrance, tels que les vecteurs viraux et les nanoparticules sont aussi à l'étude car ils permettraient la co-administration de l'antigène et d'un adjuvant ou de plusieurs antigènes différents (Figure 20).[101]

Ce type de vaccin est encore au stade expérimental[72].

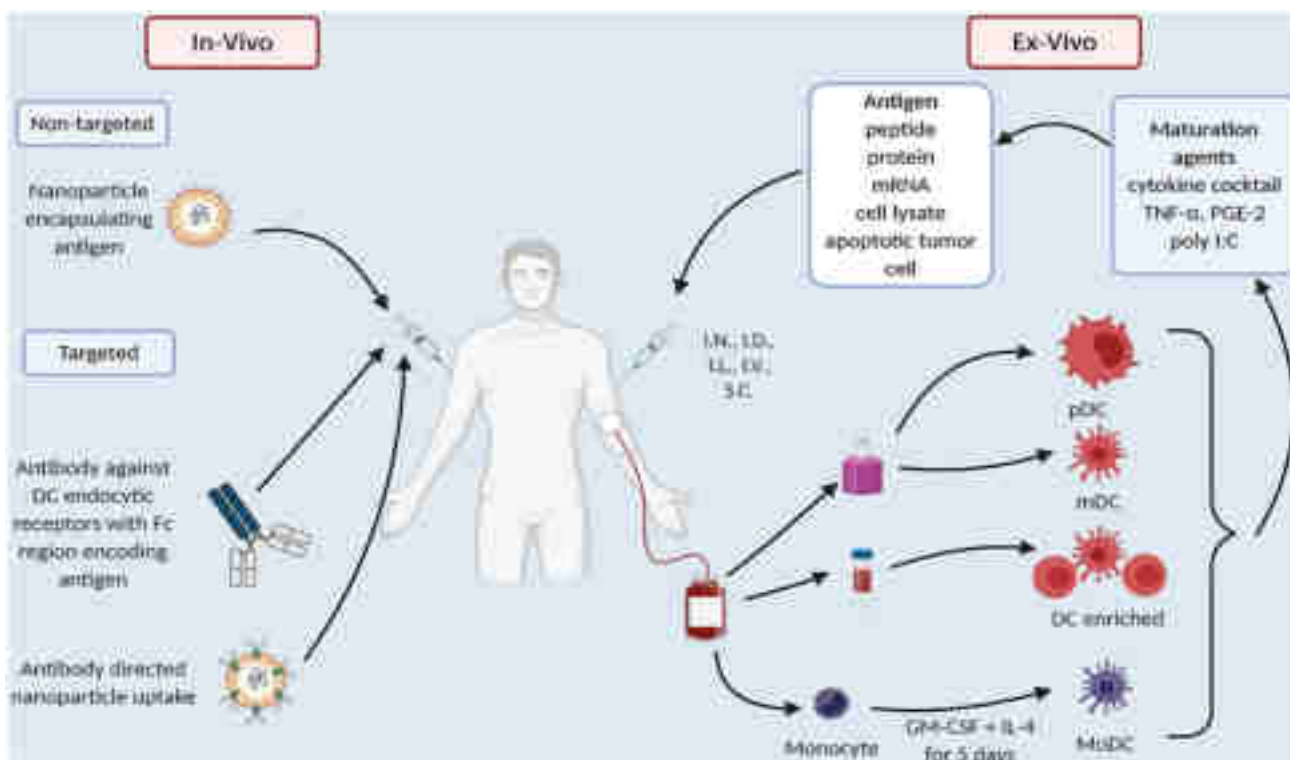


Figure 20 Les stratégies de vaccination utilisant les cellules présentatrices d'antigènes. D'après « *New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer* » de Sutherland SIM, Ju X, Horvath LG, Clark GJ. *Moving. Front Immunol.* 2021 Mar 29. Représentation schématique comparant l'approche *in vivo* et l'approche *ex vivo* dans le cadre des vaccins à cellules présentatrices d'antigènes. L'approche *in vivo* peut être ciblée, en utilisant des anticorps dirigés contre les récepteurs des cellules dendritiques et dont le fragment cristallisable (Fc) code pour l'antigène ciblé ou en ayant recours à l'absorption de nanoparticules dirigée par un anticorps, ou non-ciblée, à l'aide d'antigènes encapsulés dans des nanoparticules. Au cours de l'approche *ex vivo* les cellules présentatrices d'antigène sont prélevées chez le patient, puis exposées à des agents induisant leur maturation, avant d'être activées à l'aide d'antigènes variés. Elles sont ensuite réinjectées au patient.

#### f. Les vaccins à ADN

Ces vaccins ont pour but l'introduction d'un plasmide (ADN circulaire double brin) codant pour une protéine d'un pathogène et possédant un promoteur dans les cellules de l'hôte. Les vaccins à ADN ne présentent pas de risque de développer la maladie puisqu'ils ne permettent pas l'expression de l'ensemble des éléments d'un pathogène. De plus, leur structure double-brin leur confère une certaine stabilité. Des vaccins à ADN contre Ebola et le virus Zika sont en cours de développement.



Cependant l'efficacité de ces vaccins s'est avérée variable au cours des différentes phases de test ayant été menées. Des résultats prometteurs ont d'abord été obtenus chez des rongeurs, mais ces résultats n'ont tout d'abord pas été retrouvés chez les humains. Une des hypothèses avancées étant la faible quantité d'antigène produite suite à l'injection du plasmide[105]. Une des techniques retenues pour augmenter la production d'antigène est d'appliquer un choc électrique à la zone concernée suite à l'injection en effectuant une électroporation pour déstabiliser la membrane plasmique (*Figure 21*), la rendant ainsi plus poreuse, ce qui facilitera la pénétration du plasmide dans les cellules[95]. Cette approche a comme objectif d'améliorer l'expression du gène codant l'antigène ainsi que de diminuer la variabilité inter-individuelle observée au cours des études.

En 1999 Mir et al. ont cherché à déterminer les paramètres optimaux d'électroporation, c'est-à-dire entraînant une très bonne perméabilisation de la membrane plasmique tout en n'impactant pas ou peu la survie cellulaire. Ils se sont tout d'abord basés sur les paramètres utilisés en électrochimiothérapie pour la bléomycine[106], [107]. Pour cette technique des séries d'ondes de 100  $\mu$ s et de 800 à 1500 V/cm ont été utilisées. Les chercheurs se sont par la suite aperçus que pour la transfection d'ADN des séries d'ondes plus longues mais moins fortes s'avéraient plus efficaces. Pour quantifier l'expression de l'ADN transfecté, ce dernier contenait un gène rapporteur de luciférase. En utilisant une série de 8 impulsions de 100  $\mu$ s à 1200 V/cm l'expression de luciférase était divisée par 50 par rapport à la condition sans impulsions électriques, tandis qu'avec une série de 8 impulsions de 20 ms à 200 V/cm l'expression de luciférase était multipliée par 100 et la variabilité interindividuelle diminuée. De plus, cette technique s'est avérée efficace sur 149 muscles différents. Avec ou sans électroporation, la cinétique d'expression de la luciférase s'est avérée identique, avec une détection possible 3h après l'injection, un plateau atteint dès 3 jours et se maintenant pendant 270 jours. Cependant le niveau d'expression de la luciférase était supérieur après électroporation.

Contrairement aux petites molécules pour lesquelles l'électroporation a été testée, les plasmides doivent être injectés avant l'électroporation pour obtenir une transfection optimale.

## Physical transfection methods: electroporation

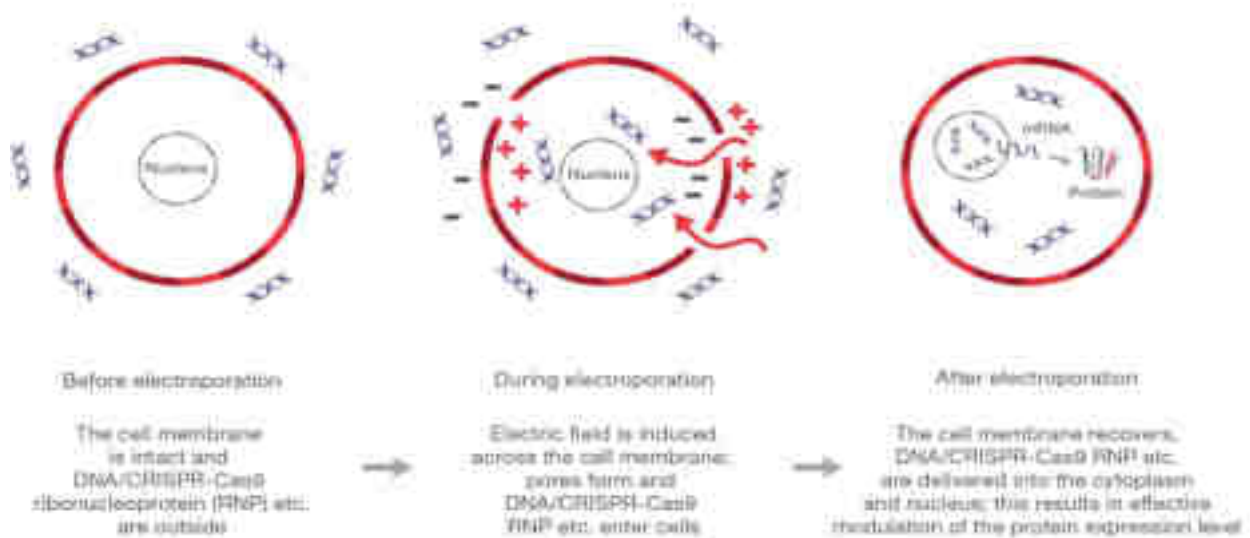


Figure 21 L'électroporation. ThermoFisher « Système de transfection fermé, facile à utiliser et évolutif pour la fabrication de thérapies cellulaires ». Représentation schématique du mode d'action de l'électroporation, permettant l'entrée de matériel génétique dans les cellules. La première étape montre la cellule avant l'électroporation, sa membrane est intacte et les éléments à transférer se trouvent à l'extérieur. Le schéma du milieu représente l'électroporation à proprement parler, l'application d'un champ électrique entraîne l'apparition de pores dans la membrane cellulaire, permettant ainsi aux éléments à transférer d'entrer dans la cellule. Enfin, après l'arrêt du champ électrique la membrane cellulaire regagne son intégrité.

### g. Les vaccins à ARN messenger

#### i. La chronologie de la découverte des vaccins à ARNm

Comme beaucoup de grandes découvertes scientifiques, le développement de vaccins à ARNm ne se résume pas à quelques mois de recherches dans un laboratoire spécifique. Bien au contraire, la mise au point de cette technique s'étale sur plus de 30 ans et a demandé la participation de centaines de chercheurs à travers le monde.

La découverte des deux principaux composants des vaccins à ARNm, c'est-à-dire l'ARNm lui-même, mais aussi les liposomes pouvant servir de vecteurs, a lieu au cours des années 60[108] (Figure 22).

En 1978, des chercheurs tels que M. Ostro[3] et G. Dimitriadis[4] ont commencé à utiliser les ARNm pour induire l'expression de protéines dans des cellules murines et humaines. Pour ce faire ils ont utilisé des liposomes comme vecteurs et comme protection des ARNm. Cependant, l'utilisation des ARNm, que ce soit en recherche ou en thérapeutique, n'a commencé à percer que quelques années plus tard.

Lorsqu'en 1984, des chercheurs de l'Université de Harvard, P. Krieg, D. Melton, T. Maniatis et M. Green, ont réussi à produire de l'ARNm biologiquement actif, à l'aide de l'ARN-polymérase du bactériophage SP6[7], [8], cette technique a majoritairement été perçue comme une avancée pour la recherche et notamment pour l'étude de la fonction des gènes et de leur activité.

C'est à la fin de l'année 1987 qu'un chercheur du Salk Institute for Biological Studies, Robert Malone, a découvert la capacité d'un mélange de gouttelettes lipidiques et d'ARNm à faire exprimer des protéines à des cellules ayant été baignées dans ce mélange. À partir de ce moment-là, les ARNm ne sont plus seulement vus comme des outils de recherche mais aussi comme de potentiels candidats-médicaments. Malone poursuivra ses recherches concernant les vaccins à ARNm, notamment en s'intéressant au VIH en 1989 avec l'équipe de la société Vical, qu'il quittera quelques mois plus tard en raison d'un conflit concernant la propriété intellectuelle de ses recherches sur les vaccins à ARNm.

En 1992, G. Jirikowski et son équipe sont les premiers à utiliser les ARNm pour remplacer la production d'une protéine déficiente entraînant un diabète insipide chez le rat[11].

De son côté, la société Strasbourgeoise Transgène et P. Meulien, sont les premiers à montrer une réponse antivirale spécifique des lymphocytes T cytotoxiques contre le virus de la grippe chez les souris grâce à l'utilisation d'ARNm vectorisés par des liposomes en 1993[13]. La technique sera brevetée puis abandonnée par la société en raison de l'investissement nécessaire à son développement, près de 100 millions d'euros. Les recherches de Transgène s'orienteront alors vers les vaccins à ADN.

En 1997, Eli Gilboa de l'Université de Duke, fonde la première entreprise d'ARNm thérapeutiques en se basant sur la technique qu'il a mise au point et qui consiste à prélever des cellules immunitaires sanguines, à les mettre en contact avec des ARNm codant pour des protéines tumorales, puis à les réinjecter aux patients afin qu'elles puissent éduquer son système immunitaire contre les tumeurs.

Au début des années 1990, un certain nombre de grandes entreprises pharmaceutiques, telles que Merck en 1991, ont préféré mettre en pause le développement de vaccins à ARNm, les considérant comme trop chers et trop instables.

Cependant, en 2000, Ingmar Hoerr de l'Université de Tübingen, prouve que des injections d'ARNm nus entraînent une réponse immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques et la production d'anticorps chez la souris[17].

Le développement des nanoparticules lipidiques (NPL) est une avancée qui aura joué un rôle majeur dans le domaine des vaccins à ARNm. Ce type de nanoparticules est décrite pour la première fois en 2001, par l'équipe de Pieter Cullis de l'Université de Vancouver.

En 2005, les chercheurs Katalin Karikó et Drew Weissman de l'Université de Pennsylvanie, démontrent que modifier la séquence de l'ARNm facilite la non-reconnaissance par les défenses immunitaires cellulaires[20], [21].

La recherche sur l'utilisation des ARNm en tant que vaccins ou traitements a été fortement relancée en 2012 lorsque la DARPA américaine a décidé de financer ces recherches. C'est cette même année qu'auront lieu les premiers tests de vaccins à ARNm encapsulés dans des NPL, chez les souris. Le premier essai clinique pour un vaccin à ARNm contre le virus de la rage a eu lieu en 2013. Il a été suivi

en 2015 par le premier essai clinique pour un vaccin à ARNm encapsulé dans des NPL contre le virus de la grippe.

En 2018 le Patisiran, un ARN interférent utilisé dans le cadre des amyloses héréditaires à transthyréline a été le premier médicament contenant des NPL à être approuvé.

Avec l'apparition de la COVID-19 en 2020, les recherches sur les vaccins antiviraux à ARNm ont pris un nouvel essor.

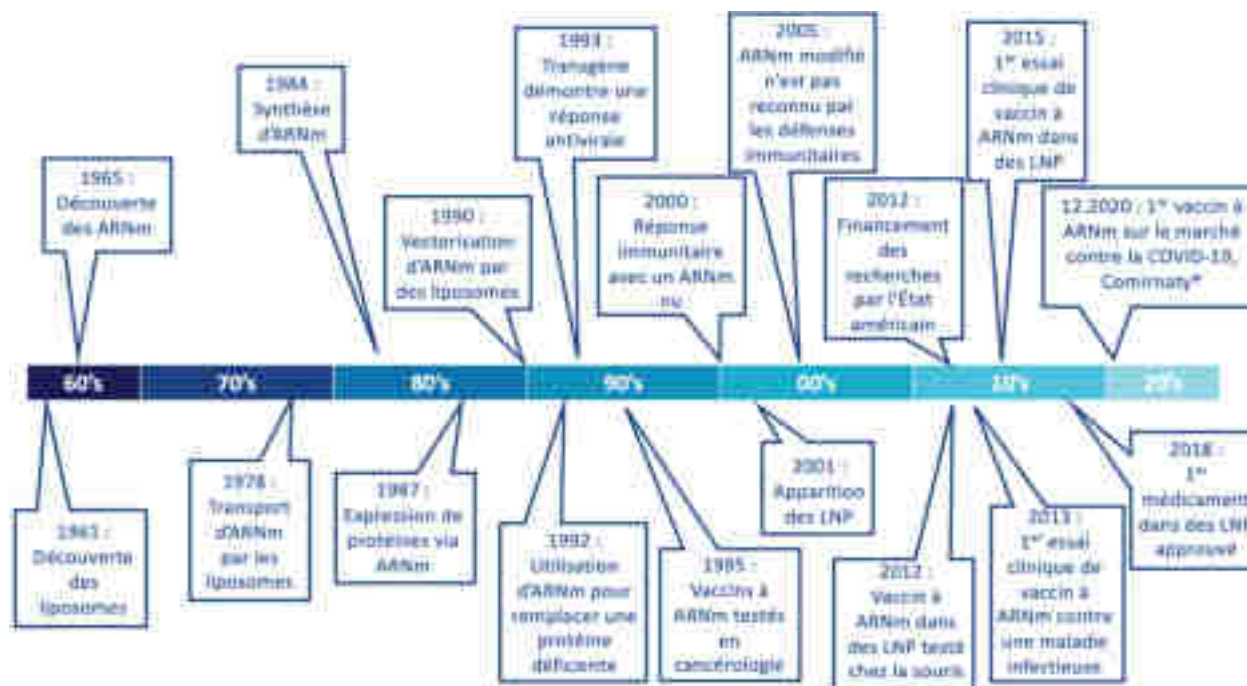


Figure 22 Frise chronologique des vaccins à ARN. Cette frise retrace les événements majeurs du développement des vaccins à ARNm de 1961 à nos jours. Figure réalisée par mes soins.

## ii. Qu'est-ce qu'un vaccin à ARNm ?

Un vaccin à ARNm, consiste en une injection d'ARNm, le plus souvent encapsulé dans des NPL, codant pour des protéines virales ou tumorales[79]. Cet ARNm est le plus souvent composé d'une coiffe à l'extrémité 5', suivie de la région 5' UTR, puis d'un peptide signal, de la séquence codant pour la protéine d'intérêt (GOI), de la région 3' UTR et de la queue polyA (Figure 23).

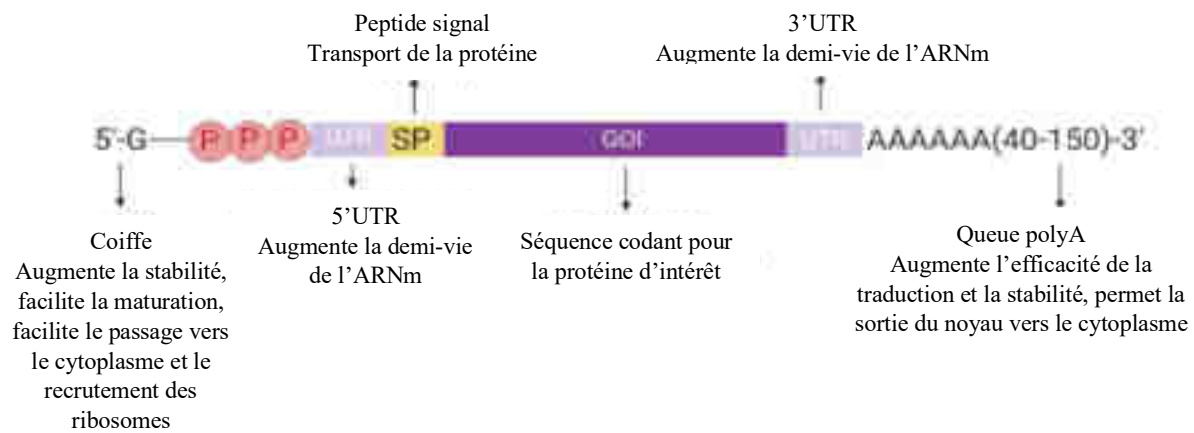


Figure 23 Construction d'un ARNm, « Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections », L. Versteeg, Septembre 2019. Représentation schématique d'un ARNm avec la coiffe, les régions non-traduites (5' et 3' UTR), la queue polyA et la séquence optionnelle codant pour le peptide signal en amont de la séquence codant la protéine d'intérêt.

Cette NPL va ensuite être endocytée par des cellules de l'hôte, dans le cytosol desquelles l'ARNm va être libéré. Ces ARNm seront alors traduits en protéines par la machinerie cellulaire de l'hôte, qui pourront à leur tour être présentées aux cellules de l'immunité afin de les éduquer, par l'intermédiaire des molécules du CMH. Cette technique fait appel à la machinerie cellulaire de l'hôte d'une manière qui se rapproche de celle utilisée par le virus en cas d'infection (Figure 24).

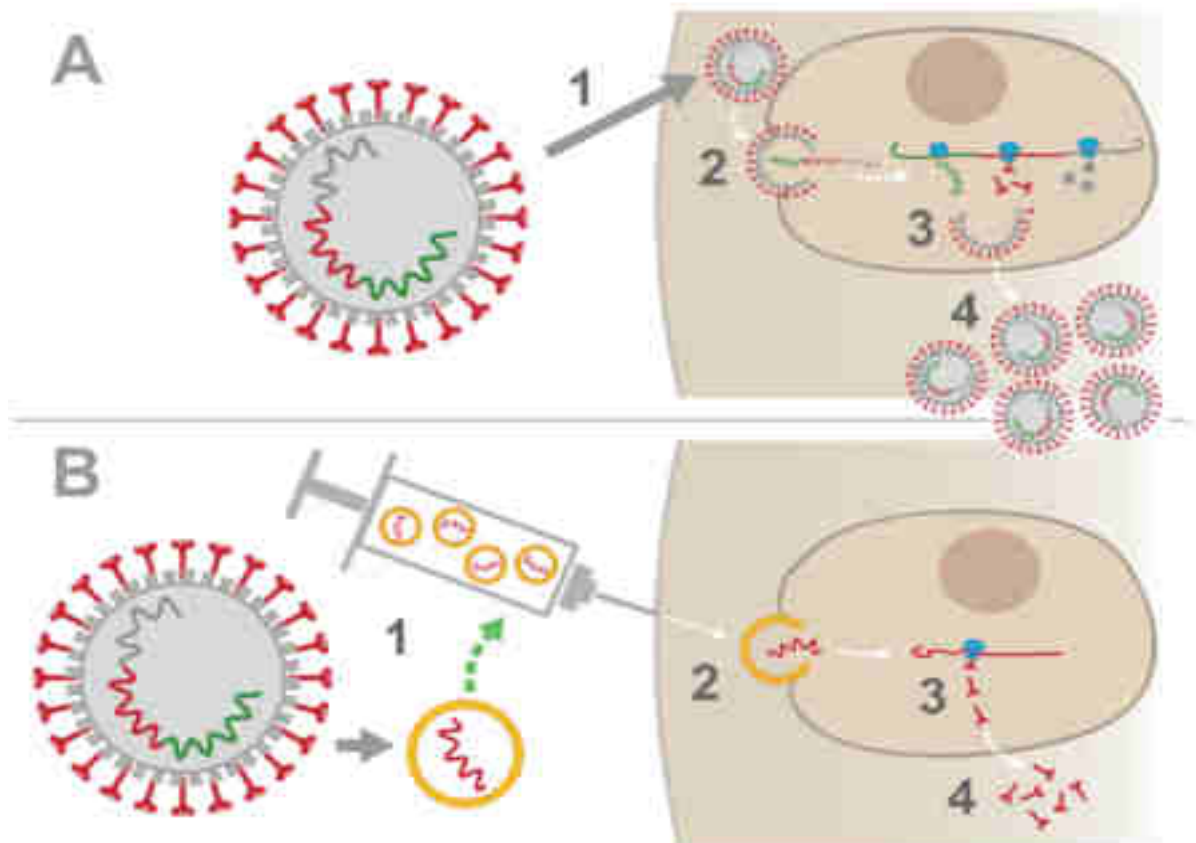


Figure 24 Comparaison entre l'infection naturelle du coronavirus et la vaccination avec un ARNm, « Développement d'un vaccin », <https://www.infovac.ch/fr/faq/developpement-d-un-vaccin>, 4 octobre 2021. Représentation schématique de l'infection naturelle par le coronavirus (A), avec l'entrée du virus dans l'organisme et sa fixation à une cellule grâce à la protéine Spike (1), l'entrée du virus dans la cellule et la libération de son ARN (2), la réplication du virus par la machinerie cellulaire (3) et la libération de nouveaux virus dans l'organisme (5). Représentation schématique de la vaccination par un vaccin à ARNm codant pour la protéine Spike (B) avec l'injection intramusculaire du vaccin, dont les ARNm ont été encapsulés dans des NPL (1) suivie de l'internalisation de ces NLP par les cellules de l'hôte et de la libération de l'ARN dans le cytoplasme (2) ce qui permet à la machinerie cellulaire de l'hôte de produire la protéine Spike (3) qui est ensuite exportée hors de la cellule où le système immunitaire pourra la reconnaître, entraînant ainsi l'immunisation de l'hôte (4).

### iii. Vaccins à ARNm autoréplicatifs

Les vaccins à ARN autoréplicatifs (saRNA) font appel à la capacité des alphavirus et des flavivirus à s'autorépliquer en contenant des séquences codant pour une réplicase. Les vaccins contiennent des séquences codant pour des protéines non-structurales (nsP) de ces virus mais les séquences codant pour leurs protéines structurales (SP) ont été remplacées par l'ARN codant pour l'antigène à produire, ce qui empêche la production de particules virales infectieuses (Figure 25).



Figure 25 Construction d'un ARNm autorépliatif, « Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections », L. Versteeg, Septembre 2019. Représentation schématique d'un ARNm avec les séquences de 4 protéines non-structurales d'un alphavirus (nsP1, 2, 3 et 4) insérées entre la région 5'UTR et le gène d'intérêt (GOI), les régions non-traduites (5' et 3' UTR), la queue polyA et la séquence optionnelle codant pour le peptide signal en amont de la séquence codant la protéine d'intérêt.

Ce système se base sur la synthèse d'un complexe d'ARN-polymérase ARN-dépendante. La séquence codant pour les protéines non-structurales va permettre la synthèse de réplisases qui vont produire la séquence complémentaire à celle de l'ARN administré et qui vont ensuite répliquer l'ARN en de nombreuses copies, augmentant ainsi la quantité de protéines produite et le temps pendant lequel ces protéines vont être produites[109] (Figure 26).

Cependant, cette technique présente plusieurs limites. Premièrement, les séquences des ARN autorépliatifs étant plus longues, les étapes de leur production et de leur purification sont plus complexes qu'avec des ARNm conventionnels. Deuxièmement, l'autoréplication peut entraîner de l'inflammation qui va s'opposer à la production de l'antigène, ainsi que le développement de réponses immunitaires mémoire dirigées contre les protéines de répliation qui peuvent limiter l'utilisation répétée de tels systèmes. Enfin, une répliation prolongée de l'ARNm administré peut entraîner une diminution de la viabilité des cellules de l'hôte.

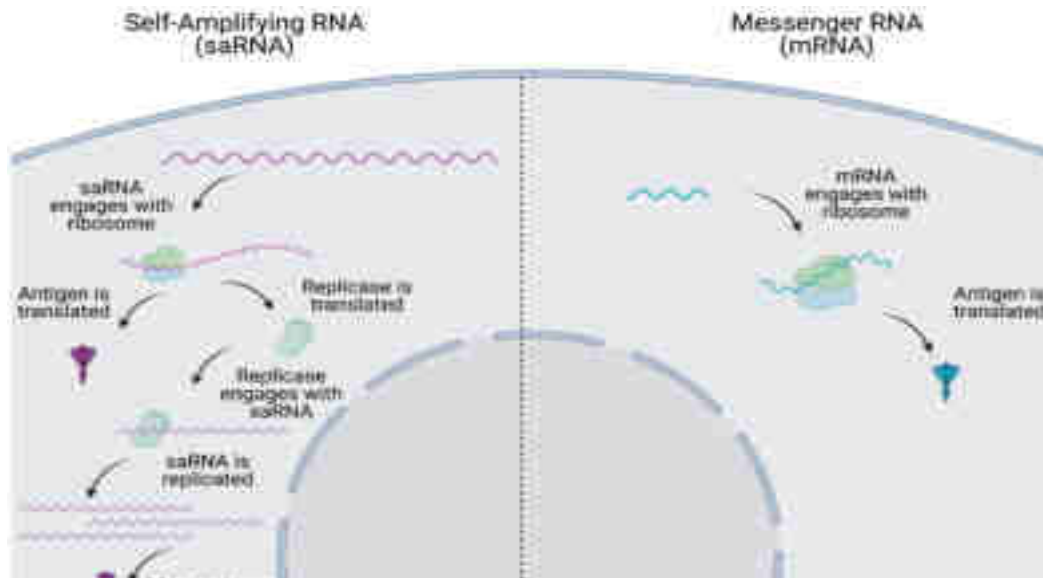


Figure 26 Différences intracellulaires entre les ARNm et les ARNs. D'après « *The next generation of RNA vaccines: self-amplifying RNA* », Anna Blakney, 2021. Les constructions d'ARN autorépliatif contiennent la séquence codant pour 4 protéines non structurales, nsP1-4, un promoteur subgénomique et le gène d'intérêt. Après avoir atteint le cytoplasme, l'ARN est traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte, produisant ainsi la production de l'antigène d'intérêt et d'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) qui va répliquer l'ARN en de nombreuses copies qui seront traduites à leur tour permettant une expression d'antigènes plus forte qu'avec un ARNm non répliqué.

#### iv. Vaccins à ARNm trans-répliatifs

Dans le cadre de cette approche, deux brins d'ARN sont nécessaires, le premier ARN est autorépliatif et code pour la réplacase et le deuxième est un ARN conventionnel codant pour la protéine d'intérêt (Figure 27). Cette technique présente l'avantage d'augmenter la quantité de protéines produites tout en séparant la réplacase de la protéine d'intérêt. Ainsi, le vaccin peut plus facilement être adapté en cas de mutation du pathogène puisqu'il suffira de modifier l'ARN codant pour la protéine d'intérêt sans avoir à toucher à la séquence codant pour la réplacase. Les ARN utilisés seront également plus courts, ce qui facilite leur production[110].

Les constructions de saRNA qui ont été utilisées pour la délivrance de gènes ou pour des applications vaccinales ont toujours été dérivées d'alphavirus tels que le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV), le virus de la forêt de Semliki (SFV) ou le virus Sindbis. Ces constructions d'ARN autorépliatif contiennent les quatre protéines non structurales, un promoteur subgénomique et le gène d'intérêt (remplaçant les protéines structurales virales). En supprimant les protéines structurales virales, l'ARN est incapable de produire un virus infectieux. Après avoir atteint le cytoplasme, les protéines non structurales forment une ARN polymérase ARN-dépendante (RDRP) qui réplique à la fois l'ARN génomique (brin d'ARN entier) et l'ARN sous-génomique (gène d'intérêt). Chacune des quatre protéines non structurales joue un rôle dans la formation de la RDRP, qui est un processus complexe en plusieurs



étapes. Cette répliation de l'ARN est à l'origine d'une plus forte expression d'antigènes que l'ARNm non répliqué.

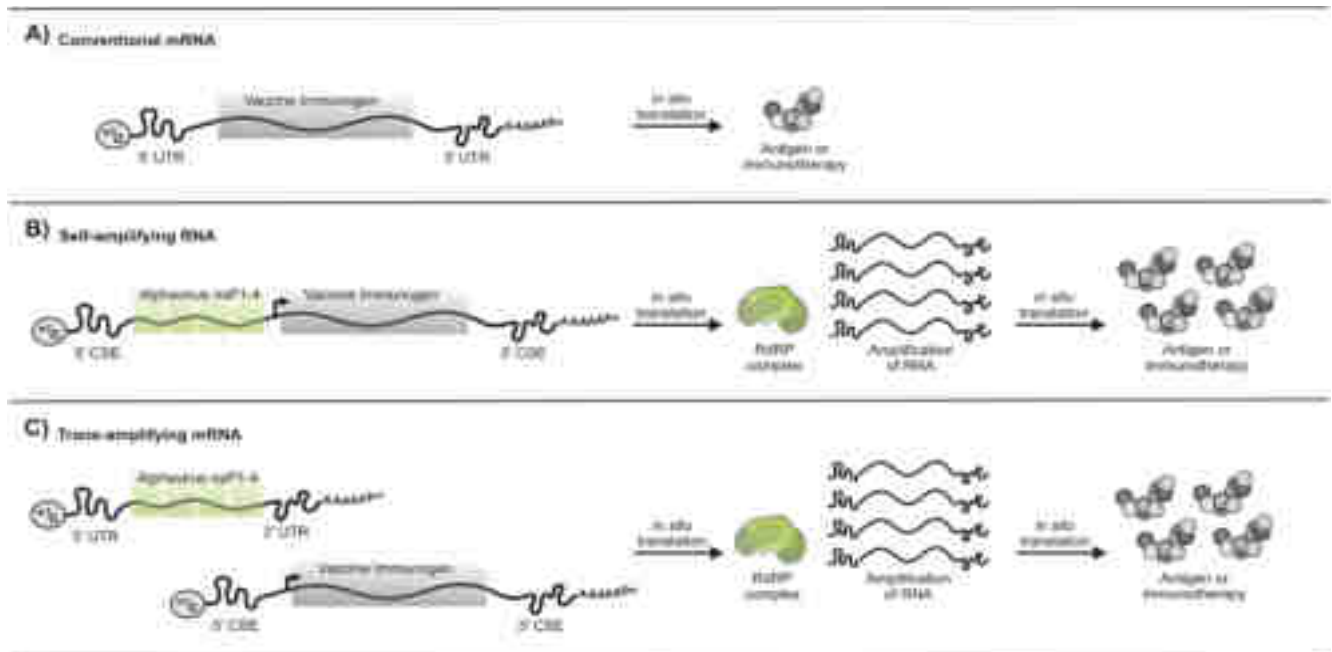


Figure 27 Constructions de vaccins à ARNm autorépliatif et trans-répliatif. D'après « Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases », K. Bloom et al, 2020. Comparaison du fonctionnement d'un ARN conventionnel (A), auto-répliatif (B) et trans-répliatif (C). Un ARNm conventionnel sera traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte mais l'ARN model ne sera pas répliqué. Pour produire une grande quantité de protéine il faut donc injecter une grande quantité l'ARN au patient (A). Dans le cas de l'ARN auto-répliatif l'antigène d'intérêt et la RdRP sont codés sur le même brin d'ARN (B), tandis l'ARN trans-répliatif fait appel à deux brins d'ARN distincts, mais le mécanisme reste le même. Après la traduction *in situ*, les protéines nsP1-4 forment le complexe RdRP et amplifient le transcrit codant pour l'antigène (C). CSE = éléments à séquence conservée ; RdRP =ARN-polymérase ARN-dépendante.

#### 1.1.1.1. Mécanisme d'action des vaccins à ARNm

Les vaccins à ARNm sont capables d'activer aussi bien l'immunité humorale que l'immunité cellulaire, augmentant ainsi leur efficacité de protection du patient face à un pathogène.

Une fois le vaccin injecté au patient, les nanoparticules lipidiques contenant l'ARNm sont endocytées par les CPA et les cellules musculaires avant d'être relarguées dans le cytoplasme par un processus d'échappement de l'endosome. L'antigène pourra ensuite être synthétisé par les cellules et être présenté à la membrane de celles-ci, activant les cellules B,  $LT_{\text{helper}}$   $CD4+$  et  $CD8+$  (Figure 28).

Les CPA peuvent présenter l'antigène directement à leur membrane, via le CMH de classe I ou celui de classe II (Figure 28).

Dans le cas d'une présentation directe de l'antigène à la membrane de la CPA, il peut être reconnu par les récepteurs des cellules B, permettant leur activation en plasmocytes et la production d'anticorps spécifiques (Figure 28).

Si l'antigène est présenté *via* le CMH de classe I, il sera reconnu par les récepteurs des cellules T cytotoxiques CD8+ qui ont pour but d'éliminer les cellules infectées après une reconnaissance spécifique (*Figure 28*).

Après avoir reconnu l'antigène présenté par le CMH de classe II, LT<sub>helper</sub>CD4+ aide à l'activation des cellules B, facilitant la production d'anticorps de haute affinité. Les LT<sub>helper</sub> CD4+ facilitent aussi l'activation des cellules cytotoxiques T CD8+ [111].

L'immunité humorale observée suite à une vaccination avec des vaccins à ARN est liée à une réponse persistante des cellules B du centre germinatif et de plasmablastes spécifiques de l'antigène dans le sang et dans les ganglions lymphatiques. Les plasmablastes sont des cellules effectrices à courte durée de vie produites lors de la réponse immunitaire précoce, contrairement aux plasmocytes à longue durée de vie, que l'on retrouve dans l'immunité humorale durable[109], [111], [112].

Certaines études ont montré l'induction rapide de hauts taux d'IgM et d'IgG dirigés contre la protéine S allant jusqu'à 6 mois après la vaccination complète par un vaccin à ARNm contre le SRAS-CoV-2 ainsi que la présence de cellules T CD4 et CD8 spécifiques à la protéine S pour la même durée[113].

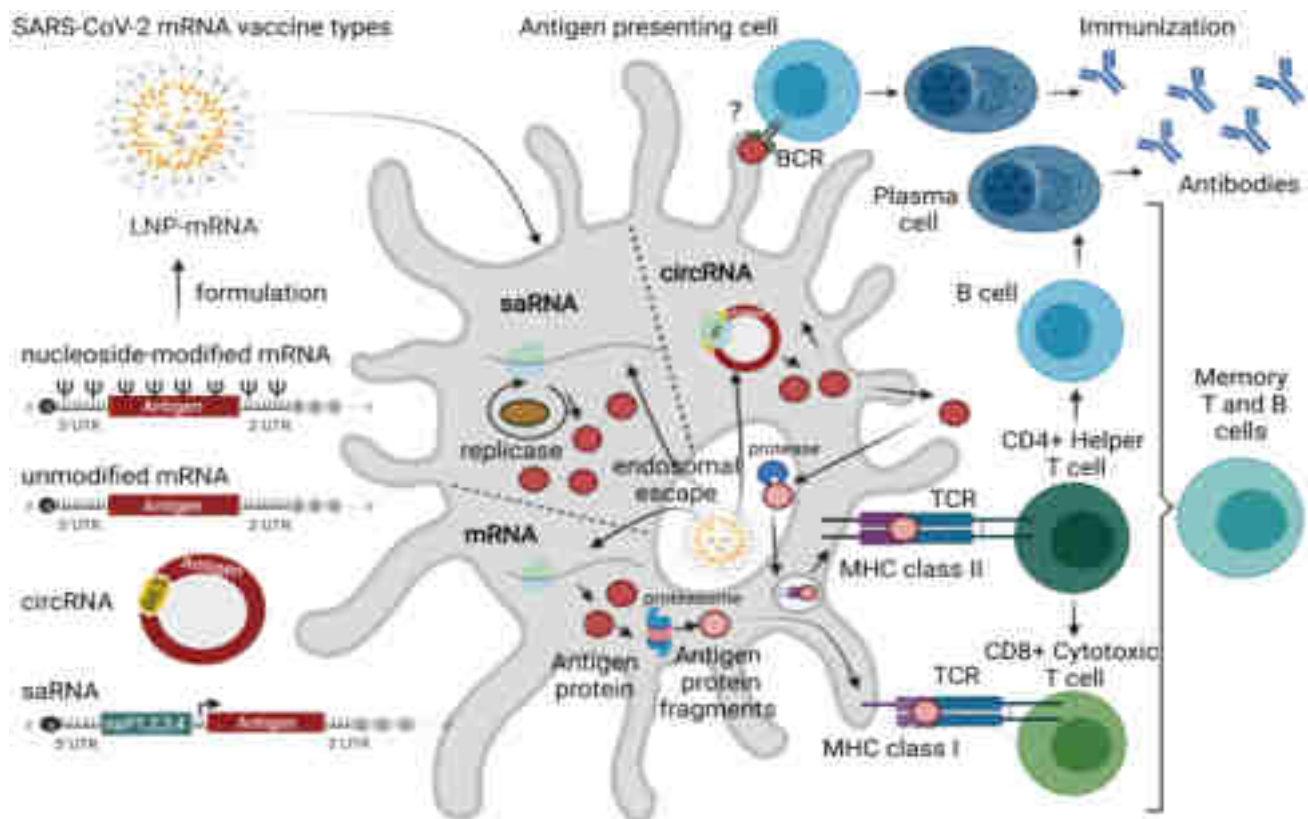


Figure 28 Immunité contre la COVID-19 obtenue à l'aide de vaccins à ARNm. D'après « COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments » de Szabó GT et al., 2022.

Ces vaccins requièrent un ARNm codant pour un antigène, cet ARN peut être linéaire, circulaire (circRNA) ou auto-répliatif (saRNA). Dans le cas des vaccins contre la COVID-19, il s'agit d'un ARN linéaire codant pour la protéine S, flanqué de régions 5' et 3'UTR, capé en 5' et avec un polyA en 3'. Des nucléosides natifs ou modifiés (Y) peuvent être utilisés lors de la synthèse *in vitro*. Les ARN encapsulés dans des nanoparticules lipidiques (LNP) sont endocytés par les cellules présentatrices d'antigènes et relargués dans leur cytoplasme grâce au processus d'échappement de l'endosome. Les cellules produisent la protéine S (points rouges), qui sera dégradée par le protéasome (points roses) et présentée aux molécules des CMH de classes I et II. La présentation via le CMH de classe I donne lieu à une réponse spécifique des cellules T cytotoxiques CD8+. Les antigènes peuvent aussi être directement attachés à la membrane cellulaire où ils pourront être reconnus par les récepteurs des cellules B (BCR) et induire la production d'anticorps. Les antigènes peuvent aussi être présentés via le CMH de classe II et induire une réponse des LT<sub>helper</sub> CD4+. Ceux-ci pourront aider à l'activation des cellules B et donc à la production d'anticorps, mais aussi à l'activation des cellules T cytotoxiques CD8+ qui pourront éliminer les cellules infectées par le virus.

## 5. Les vecteurs lipidiques

### a. Leur utilité

Pour que l'ARNm puisse être traduit en protéine et activer le système immunitaire de l'hôte, il faut tout d'abord qu'il pénètre dans le cytoplasme des cellules de l'hôte.

Cependant, la bicouche lipidique qui forme la membrane cellulaire s'oppose naturellement à cette action en remplissant son rôle de protection *vis-à-vis* de la cellule. Cette bicouche lipidique est chargée négativement tout comme l'ARNm lui-même.

De plus, l'ARNm est une molécule fragile, notamment en raison de sa constitution simple brin, et il est constamment menacé d'être dégradé par les RNases présentes dans les différents milieux biologiques.

C'est pourquoi l'encapsulation de l'ARNm est une étape clé du développement d'un vaccin. Les NPL sont endocytées et prises au piège dans des endosomes et des lysosomes, dont seule une partie des ARNm s'échappe afin de gagner le cytosol et de permettre la production de protéines.

## b. Les différents vecteurs lipidiques utilisés

### i. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées de lipides et renfermant une substance active (*Figure 29*). Ils sont étudiés pour le transport d'ARNm depuis presque 30 ans. En 1994, des chercheurs ont démontré qu'en utilisant de l'ARNm complexé à des liposomes cationiques l'expression protéique était équivalente à celle obtenue avec un ADN plasmidique[114].

De plus, la protection de l'ARN par les liposomes contre les RNases est plus ou moins importante selon la voie d'administration utilisée, comme l'a prouvée l'étude de *Nair et al* [115], en démontrant une augmentation de la transfection des cellules avec les ARNm protégés par rapport aux non-protégés suite à des injections intraveineuses ou intranasales mais pas avec des injections sous-cutanées.

Les liposomes composés de lipides cationiques, comme le DOTMA ou le DOTAP, sont utilisés depuis un certain temps pour la délivrance d'ADN ou d'ARN *in vitro* et *in vivo*. Les liposomes peuvent aussi être composés de lipides ionisables qui sont neutres à pH physiologique mais deviennent ionisés et protonés en conditions acides, comme dans les endosomes et les lysosomes, ce qui induit une rupture osmotique de l'endosome ou du lysosome, permettant l'échappement de l'ARN[116].

Ces complexes ARNm-liposomes sont le plus souvent chargés positivement en conditions physiologiques et peuvent donc se lier à des molécules chargées négativement et présentes dans les fluides biologiques telles que l'albumine. Cette liaison risque donc de diminuer l'efficacité des liposomes.[117]

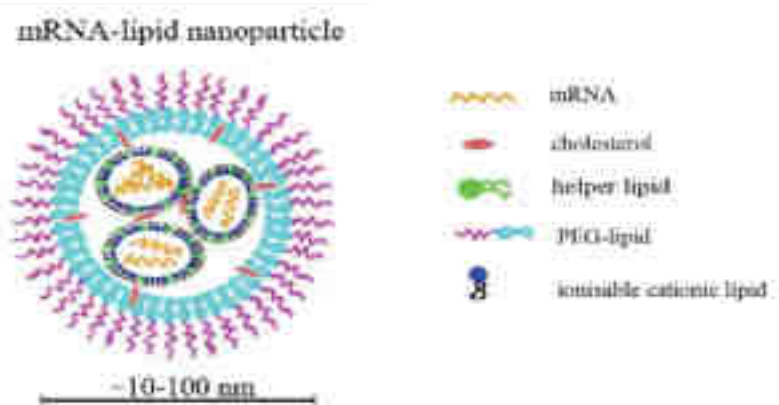


*Figure 29* Liposome contenant de l'ARN, d'après « *Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology* », Y. Weng et al., 2019. Représentation schématique d'un liposome, composé d'une bicouche de lipides encapsulant de l'ARN.

## ii. Les nanoparticules lipidiques

La particularité de cette technique repose sur l'encapsulation de l'ARNm dans des nanoparticules, c'est-à-dire des particules dont les dimensions sont comprises entre 10 et 200 nm dans les trois dimensions, qui sont presque neutres dans des conditions physiologiques et qui deviennent chargées positivement à potentiel hydrogène (pH) acide (*Figure 30*). Cette caractéristique repose sur l'utilisation de lipides ionisables pour former les nanoparticules et permet d'éviter leur liaison à des molécules chargées négativement, contrairement aux liposomes classiques, tout en facilitant la sortie de l'ARNm de l'endosome vers le cytoplasme des cellules.

Ces NPL sont préparées en dissolvant les lipides dans un solvant tel que l'éthanol et l'ARNm dans un tampon aqueux à pH faible (3,5-5,5). Les deux solutions sont ensuite mélangées à l'aide de dispositifs microfluidiques. Ce mélange va faire passer le solvant sous un seuil critique de concentration, ce qui entrainera la formation des nanoparticules [117].



*Figure 30 Nanoparticule lipidique encapsulant de l'ARNm d'ARNm, d'après « mRNA therapeutics deliver a hopeful message », Z. Zhong et al, 29 octobre 2018. Représentation schématique montrant une NPL composée d'une membrane de lipides liés à du PEG et de cholestérol, contenant des vésicules formées de lipides de soutien et de lipides ionisables cationiques entourant de l'ARNm. La taille de cette particule varie de 10 à 100 nm environ.*

## iii. Les nano-émulsions

Cette technique repose sur l'utilisation d'une nano-émulsion cationique de type huile dans eau [118] (*Figure 31*). Pour former cette émulsion, du MF59 est utilisé. Il s'agit d'un adjuvant à base de squalène qui donne la phase huileuse. Du 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP), qui est un lipide cationique, est ajouté à la phase huileuse puis ce mélange est stabilisé sous forme de gouttelettes de l'ordre du nanomètre à l'aide de surfactants. Ces gouttelettes positivement chargées sont ensuite capables de lier à leur surface des ARNm ou des ADN plasmidiques [117].

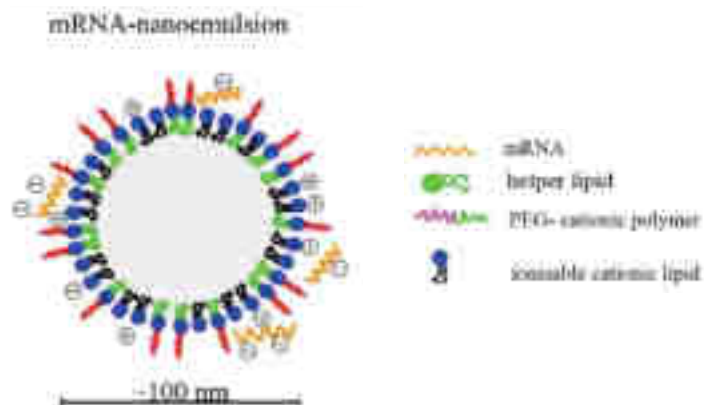


Figure 31 Nanoémulsion avec de l'ARNm, d'après « mRNA therapeutics deliver a hopeful message », Z. Zhong et al, 29 octobre 2018. Représentation schématique montrant une goutte de nanoémulsion composée d'une membrane de lipides ionisables cationiques, de polymères cationiques liés à du PEG, de lipides de soutien et d'ARNm. La taille de cette particule est d'environ 100 nm.

#### iv. Les nanoparticules lipoïdes

Ces nanoparticules sont formées de la même façon que les NPL, mais à l'aide de lipoïdes, c'est-à-dire des molécules de types lipidiques, synthétisées en liant de façon covalente de longues chaînes alkyl à des polyamines (Figure 32). Des variantes ionisables de ces lipoïdes sont aussi synthétisables. Une des caractéristiques spécifiques de ces nanoparticules lipoïdes est leur tropisme particulier. En fonction des molécules qui les composent, certaines cibleront préférentiellement le foie, d'autres les poumons[117].

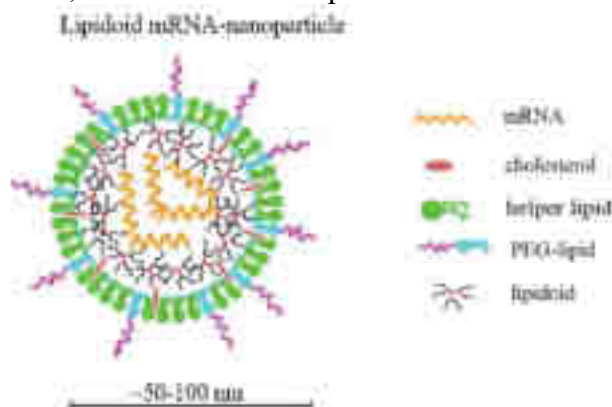


Figure 32 Nanoparticule lipoïde encapsulant de l'ARNm, d'après « mRNA therapeutics deliver a hopeful message », Z. Zhong et al, 29 octobre 2018. Représentation schématique montrant une nanoparticule lipoïde composée d'une membrane de lipides de soutien, de lipides liés à du PEG et de cholestérol, encapsulant des lipoïdes et de l'ARNm. La taille de cette particule est de 50 à 100 nm environ.

#### v. Les transporteurs à base de polymères

Les polymères cationiques ont longtemps été mis de côté suite à la démonstration de l'efficacité supérieure et de la toxicité moindre des transporteurs lipidiques.

Depuis, des études ont montré l'efficacité des nanoparticules à base de polyéthylèneimine pour la formulation de grosses molécules d'ARN telles que les ARN autorépliquatifs[119].

Les petites nano-micelles cœur-carapace polymériques mesurent entre 50 et 100 nm de diamètre et sont composées de copolymères à blocs de polyéthylène glycol-polyaspartamide (PEG-PAsp) (Figure 33). Le cœur de ces nanomicelles contient l'ARNm et la partie polyaspartamide du polymère qui condense l'ARNm grâce à ses courtes chaînes latérales et qui permet la sortie de l'ARNm de l'endosome en déstabilisant ce dernier, tandis que la partie polyéthylène glycol (PEG) forme la carapace et réduit les interactions avec les biomolécules. Cependant ces nano-micelles doivent être injectées localement en raison de leur faible stabilité dans le sérum, bien qu'un effet systémique soit observable en cas d'injection hydrodynamique[117]. D'autres nano-micelles sont à l'étude afin de synthétiser des candidats transporteurs plus stables.

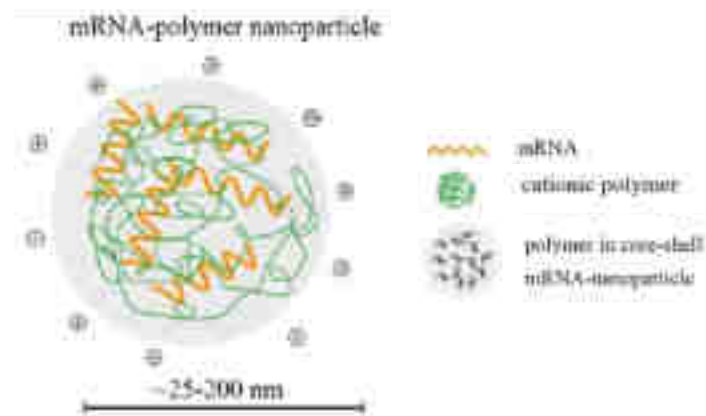


Figure 33 Nanoparticules à base de polymères encapsulant de l'ARNm, d'après « mRNA therapeutics deliver a hopeful message », Z. Zhong et al, 29 octobre 2018. Représentation schématique montrant une nanoparticule formant un noyau à base de polymères cationiques et d'ARNm. La taille de cette particule varie entre 25 et 200 nm environ.

### III. Les vaccins contre la COVID-19

#### 1. La COVID-19

La COVID-19 est une maladie causée par le SRAS-CoV-2, un nouveau virus ayant émergé à Wuhan, en Chine, en décembre 2019, appartenant à la famille des coronavirus et plus précisément au groupe des  $\beta$ -coronavirus. Il s'agit du 7<sup>ème</sup> coronavirus pathogène pour l'Homme. Le temps d'incubation de la COVID-19 varie entre 2 et 12 jours, avec une moyenne de 5 jours. Certains de ses symptômes sont peu spécifiques : maux de tête, fièvre, fatigue, douleurs musculaires, toux. L'anosmie et l'agueusie sont quant à elles plus spécifiques de cette maladie[120].

La transmission de ce virus se fait majoritairement par voie aérienne *via* les gouttelettes émises lors d'un éternuement, d'une quinte de toux ou tout simplement en parlant. Cependant un contact rapproché à moins d'un mètre et prolongé, d'au moins 15 minutes, avec une personne malade semblent être nécessaire pour donner lieu à une contamination.

Le génome du SRAS-CoV-2 est sous forme d'ARN simple brin positif, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas du brin transcrit en ARNm mais du brin complémentaire. La séquence des gènes de l'ARN viral est donc

la même que celle des ARNm. Les virus à ARN positif ont la capacité de produire des protéines sans avoir besoin d'ARN polymérase ARN-dépendante puisque leur ARN viral peut directement être traduit. Son ARN simple brin est lié à une protéine de nucléocapside (N). Ce complexe est empaqueté à l'intérieur de l'enveloppe virale qui est majoritairement composée de trois protéines : la protéine Spike (S), la protéine de membrane (M) et la protéine d'enveloppe (E). La protéine S forme des trimères qui donnent les spicules caractéristiques de cette protéine. Ces derniers sont répartis sur l'enveloppe virale et forment un sorte de couronne autour du virus, d'où son nom de « corona » (Figure 34).[113]

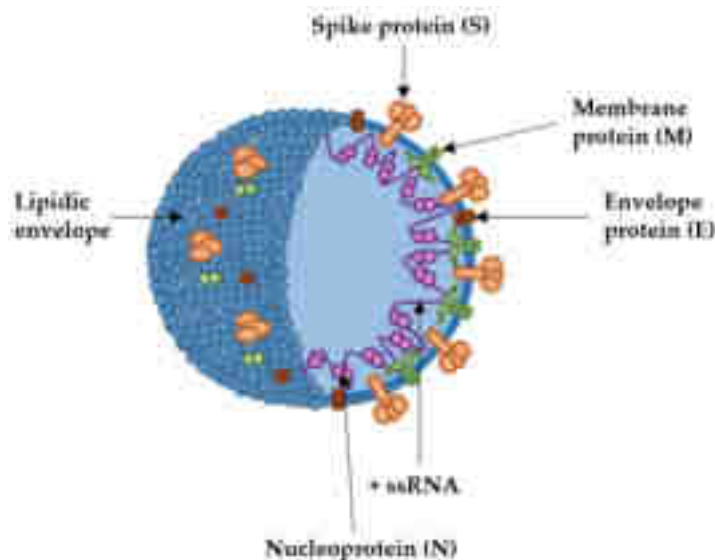


Figure 34 Structure du SRAS-CoV-2. D'après « mRNA vaccines against SARS-CoV-2 : advantages and caveats », M. Echaide et al, 2023. Représentation schématique d'un SRAS-CoV-2 avec la localisation de l'ARN simple brin (ssRNA) positif lié à la protéine de nucléocapside (N) en violet, et les trois protéines majeures formant l'enveloppe virale : la protéine Spike (S) en orange organisée en trimères, la protéine de membrane (M) en vert et la protéine d'enveloppe (E) en brun. Le virus est de forme sphérique et son diamètre mesure 100 à 120 nm.

Une des particularités des virus à ARN est leur taux de mutation élevé. En effet, l'ARN polymérase ARN dépendante n'est pas dotée d'une capacité de relecture et a un taux d'erreur de  $1/10^3$  à  $1/10^4$ , contre  $1/10^8$  à  $1/10^9$  pour l'ADN polymérase ADN dépendante.

La progression de la COVID-19 est divisée en quatre phases, l'incubation, la phase symptomatique, la phase pulmonaire précoce et la phase pulmonaire tardive (Figure 35). Le pic de contagiosité se situe à la fin de la phase d'incubation et le début de la phase symptomatique.

La réplication virale a lieu tout d'abord dans la muqueuse nasopharyngée avant de s'étendre au reste des voies respiratoires. La protéine S ou spike est une glycoprotéine retrouvée sur la capsid ou l'enveloppe virale qui permet au virus de se lier aux cellules épithéliales, et plus particulièrement à l'enzyme transmembranaire de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) présente dans les cellules endothéliales vasculaires cardiaques, dans les pneumocytes de type 2, les cellules intestinales, hépatiques et les cellules du système nerveux central[121].



Une fois liée à l'ACE2, la protéine spike subit un clivage qui est catalysé par une protéine ancrée à la membrane des cellules de l'hôte, la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2). Ce clivage donne lieu à un changement de conformation de la protéine spike, permettant ainsi la fusion membranaire du virus avec la cellule de l'hôte. Suite à cette fusion l'ARN du virus est libéré dans la cellule afin d'y être répliqué[122].

La réponse immunitaire de l'hôte passe d'abord par l'immunité innée. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) détectent la présence d'ARN étrangers dans les cellules infectées et vont ensuite activer des facteurs de transcription, dont des facteurs de régulation des interférons, qui vont activer les interférons de types I et III, et NF- $\kappa$ B, qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines permettant le recrutement de leucocytes[122].

Le SRAS-CoV-2 inhibe la synthèse d'interférons de types I et III en induisant un dysfonctionnement de la protéine transductrice de signal et activatrice de transcription 1 (STAT1). Une faible activation de la synthèse des interférons a été liée à une réplication virale rapide donnant lieu à de hautes concentrations virales dans les voies aériennes supérieures. Les cellules épithéliales infectées vont sécréter des chimiokines afin de promouvoir le recrutement de mastocytes, de macrophages et de cellules T.

Chez les patients avec une charge virale élevée, l'inoculum viral passe de l'oropharynx aux poumons où le virus va pouvoir infecter les pneumocytes de type 2 et les macrophages alvéolaires, marquant ainsi le début de la phase pulmonaire de la maladie. Les macrophages expriment le récepteur ACE-2 et deux enzymes nécessaires pour l'exposition du site de liaison du SRAS-CoV-2 et pour la fusion de la membrane cellulaire, la furine et TMPRSS2. Les variations interindividuelles d'expression des récepteurs ACE-2 pourrait déterminer la sévérité de l'infection. Les macrophages présents dans les voies respiratoires basses ont une expression supérieure des gènes codant pour des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires comparé à ceux présents dans les voies aériennes supérieures. Ils pourraient donc être responsables de l'inflammation pulmonaire excessive observée chez certains patients.[122]

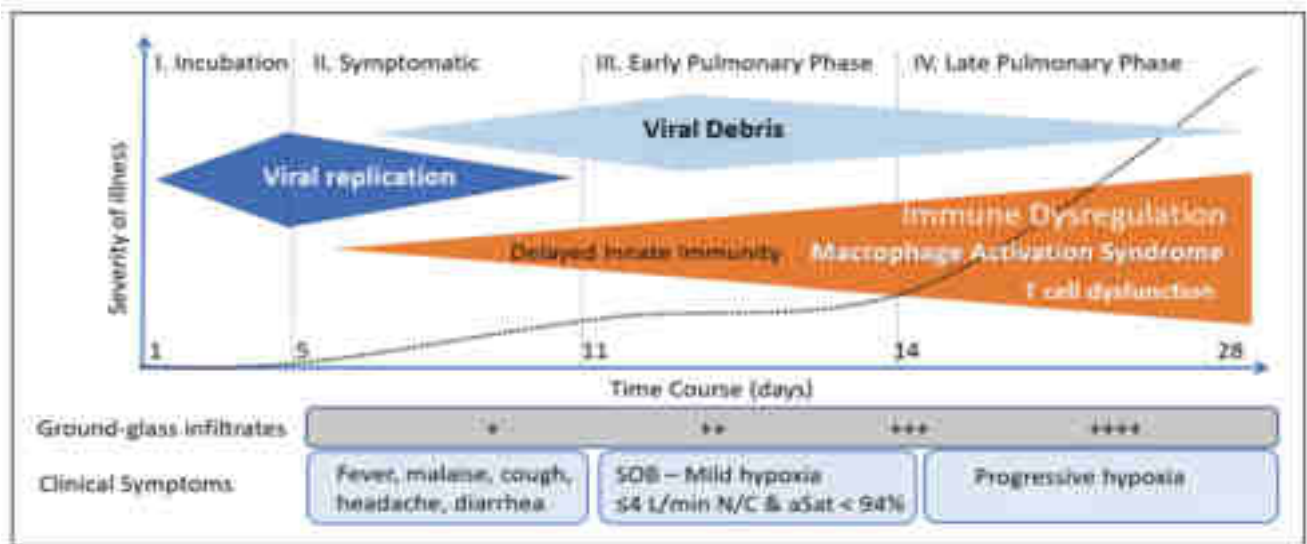


Figure 35 Phases cliniques de la COVID-19. D'après «A scoping review of the pathophysiology of COVID-19», de PE Marik et al., 2021. Schéma représentant l'évolution de la gravité de la COVID-19 en fonction du temps avec les quatre phases de la maladie : l'incubation (I), la phase symptomatique (II), la phase pulmonaire précoce (III) et la phase pulmonaire tardive (IV). Les étapes de la vie du virus sont superposées au graphique. Lors de l'incubation il y a une augmentation de la réplication virale, puis pendant la phase symptomatique celle-ci décroît en raison de l'augmentation de la réponse immunitaire tardive qui entraîne aussi une augmentation des débris viraux. Pendant la phase III la quantité de débris viraux diminue et la réponse immunitaire se dérégule petit à petit donnant lieu à un dysfonctionnement des cellules T et à un syndrome d'activation macrophagique entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation des infiltrats pulmonaires avec un aspect de verre dépoli au fur et à mesure des jours est indiquée en bas du graphique, ainsi que les symptômes les plus fréquents associés à chacune des phases symptomatiques : fièvre, malaise, toux, maux de tête et diarrhée pour la phase II ; essoufflement, hypoxie légère (volume d'air inspiré inférieur à 4 L/min et saturation artérielle en oxygène inférieure à 94%) pour la phase III et une hypoxie progressive pour la phase IV.

## 2. Comirnaty® de BioNTech

### a. Vaccin original

Ce vaccin contient du tozinaméran, un ARNm simple brin capé en 5', produit par transcription *in vitro* sans cellules à l'aide de matrice d'ADN codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 (Figure 36), avec 2 mutations d'acides aminés appartenant à l'hélice centrale en proline (K986P et V987P) afin de bloquer la conformation de la protéine de façon à ce que les molécules de l'immunité adaptative puissent plus facilement s'y lier.



Figure 36 L'ARNm du vaccin Comirnaty®. Schéma réalisé par mes soins. Schéma de l'ARN messenger du vaccin Comirnaty® avec les différents éléments qui le composent ainsi que leur position. À l'extrémité 5' se trouve la coiffe (Cap), suivie du 5' UTR, puis du peptide signal, de la séquence codante pour la protéine S avec les 2 mutations bloquant sa conformation (K986P et V987P), puis le 3'UTR et enfin la queue polyA.

Toutes les uridines ont été remplacées par des 1-méthylpseudouridines pour augmenter la stabilité de l'ARN.

Cet ARNm est non-répliatif ce qui signifie qu'il ne sera pas dupliqué et que de nouvelles molécules ne seront pas synthétisées. Il a été capé en 5' afin d'allonger sa demi-vie et donc le nombre de protéines produites. L'ajout de cette coiffe a été réalisé de manière co-transcriptionnelle en utilisant un analogue trinuécléotidique de cap1 ((m27,3'-O)Gppp(m2'-O)ApG). Le 5' UTR provient de l'ARN humain codant pour l'a-globine et sa séquence Kozak a été optimisée (GCCACCATG). Le 3'UTR contient un *enhancer* amino-terminal de séparation. Le reste de la séquence provient du 3'UTR de l'ARN mtRNR1 mitochondrial codant pour l'ARNr 12S. Cette séquence possède deux codons STOP et le polyA est lié au reste de l'ARN par un lien A30LA70 de 10 nucléotides (GCAUAUGACU). Les NPL sont formées de lipides de soutien (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ou DSPC, de cholestérol et de sucrose), de lipides ionisables (ALC-0315) et de lipides furtifs (ALC-0159). Le vaccin contient aussi du tampon PBS et des sels (Figure 37)[111].[123].

Ce vaccin est disponible sous différentes formes : des flacons multidoses contenant 6 doses de 30 µg après dilution, des flacons multidoses contenant 6 doses de 30 µg sans dilution, des flacons unidoses de 30 µg, des flacons multidoses contenant 10 doses de 10 µg après dilution et des flacons multidoses contenant 10 doses de 3 µg après dilution[123].

La posologie de ce vaccin est la suivante : 2 doses à 21 jours d'écart et une 3<sup>ème</sup> dose 28 jours après la 2<sup>nde</sup> pour les sujets immunodéprimés. Les doses varient selon la population, 0,3 mL contenant 30 µg d'ARNm codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 (tozinaméran) pour les plus de 12 ans, 0,2 mL contenant 10 µg de tozinaméran pour les enfants de 5 à 11 ans et 0,2 mL contenant 3 µg de tozinaméran pour les enfants de 6 mois à 4 ans. Ce vaccin est administré par voie intramusculaire[123].

Les effets indésirables possibles de ce vaccin sont : douleur, rougeur et gonflement au point d'injection, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires, fièvre, nausées, réactions anaphylactiques[123]. De rares cas de myocardites et de péricardites chez des adolescents et des jeunes adultes ont été observés, surtout à la seconde dose[123].

Son efficacité en phase clinique était supérieure à 95% de protection contre la COVID-19 sévère et est de 95,3% 7 jours après la dose de rappel chez les participants de plus de 16 ans[123].

Ce produit doit être conservé 2 ans entre -90 et -60°C, 2 semaines entre -25° et -15°C, 1 mois entre 2-8°C, 2h jusqu'à 30°C et 6h entre 2-30°C après dilution[123].

Ce vaccin n'est plus disponible en France.

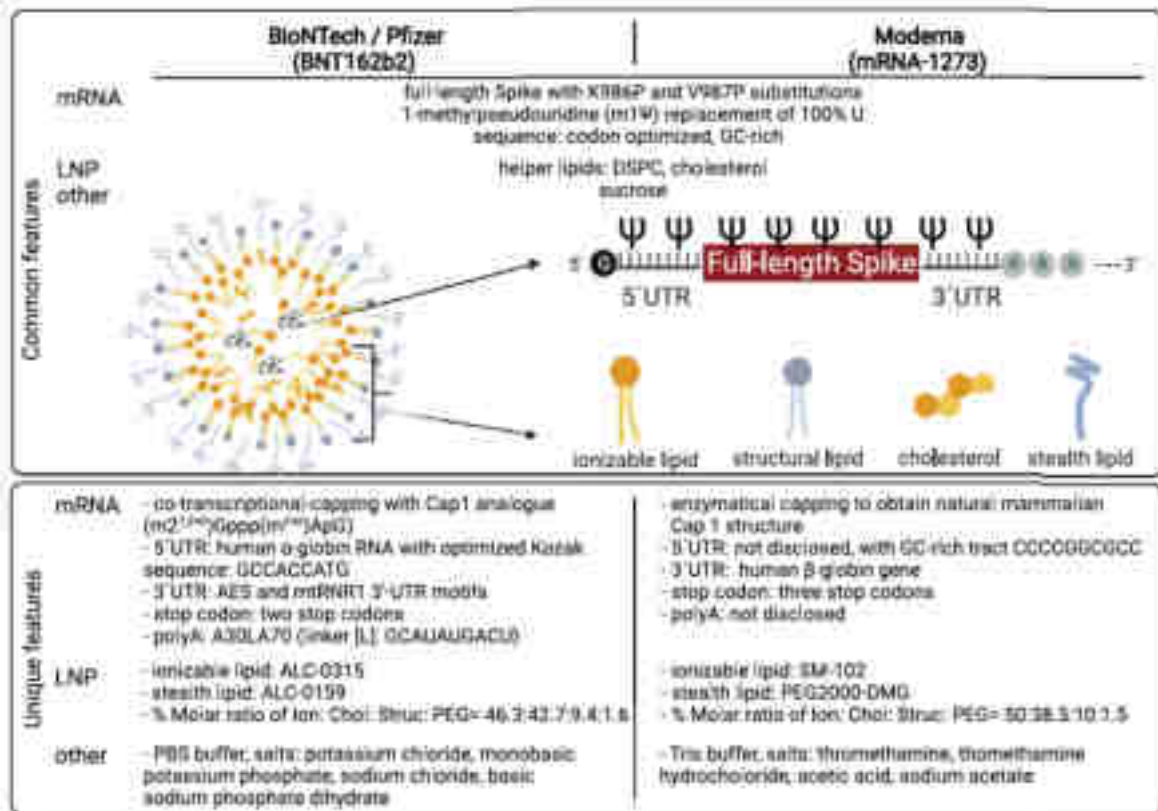


Figure 37 Schéma comparant la composition des vaccins Comirnaty® (BNT162b2) de BioNTech/Pfizer et de Spikevax® (mRNA-1273) de Moderna. D'après « COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments », de GT. Szabó et al., 2022. Dans la première partie du schéma se trouvent les éléments communs aux deux vaccins : la séquence codante avec les deux mutations K986P et V987P, le remplacement de toutes les uridines par des 1-méthylpseudouridines et les lipides de soutien des NPL. Dans la deuxième partie se trouvent les éléments qui diffèrent entre les deux vaccins : la coiffe en 5', les régions UTR, le polyA, les codons STOP, les lipides ionisables et furtifs et les tampons.

### b. Vaccins prenant en compte la forme Omicron

Suite à l'émergence de la souche Omicron du SRAS-CoV-2, de nouveaux vaccins ont été développés.

BioNTech et Pfizer ont produits 3 vaccins capables de lutter contre les différentes souches :

- Comirnaty® Original/Omicron BA.1[123] :
  - o Une dose contient 15 µg de tozinaméran et 15 µg de riltozinaméran (ARNm simple brin avec une coiffe en 5', produit par transcription *in vitro* sans cellule à l'aide d'ADN codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 Omicron BA.1.
  - o Disponible en flacons multidoses contenant 6 doses de 0,3 mL

- La posologie est d'une dose unique chez les personnes ayant déjà reçu un schéma de primo-vaccination contre la COVID-19, dont la dose la plus récente a été administrée au moins 3 mois auparavant. Chez les individus immunodéprimés des doses supplémentaires sont possibles.
  - Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
  - Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Comirnaty® Original.
  - Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Comirnaty® Original.
  - Ce vaccin n'est plus disponible en France.
- Comirnaty® Original/Omicron BA.4-5[123] :
- Une dose contient soit :
    - 15 µg de tozinaméran et 15 µg de famtozinaméran (ARNm simple brin avec une coiffe en 5', produit par transcription *in vitro* sans cellule à l'aide d'ADN codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 Omicron BA.4-5). Disponible en flacons multidoses contenant 6 doses de 0,3 mL ou en flacons unidoses pour les plus de 12 ans.
    - 5 µg de tozinaméran et 5 µg de famtozinaméran. Disponible en flacons multidoses contenant 10 doses de 0,2 mL après dilution, en flacons multidoses contenant 6 doses de 0,3 mL sans dilution ou en flacons unidoses de 0,3 mL pour les enfants de 5 à 11 ans.
    - 1,5 µg de tozinaméran et 1,5 µg de famtozinaméran. Disponible en flacons multidoses contenant 10 doses de 0,2 mL pour les enfants de 6 mois à 4 ans.
  - La posologie est d'une dose unique chez les personnes ayant déjà reçu un schéma de primo-vaccination contre la COVID-19, dont la dose la plus récente a été administrée au moins 3 mois auparavant. Chez les individus immunodéprimés des doses supplémentaires sont possibles.
  - Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
  - Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Comirnaty® Original.
  - Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Comirnaty® Original.
  - Ce vaccin n'est plus disponible en France.
- Comirnaty® Omicron XBB.1.5[123] :
- Une dose contient soit :
    - 30 µg de raxtozinaméran (ARNm simple brin avec une coiffe en 5', produit par transcription *in vitro* sans cellule à l'aide d'ADN codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 Omicron XBB.1.5). Disponible en flacons multidoses contenant 6 doses de 0,3 mL ou en flacons unidoses pour les plus de 12 ans.

- 10 µg de raxtozinaméran. Disponible en flacons multidoses contenant 10 doses de 0,2 mL après dilution, en flacons multidoses contenant 6 doses de 0,3 mL sans dilution ou en flacons unidoses de 0,3 mL pour les enfants de 5 à 11 ans.
- 3 µg de raxtozinaméran. Disponible en flacons multidoses contenant 10 doses de 0,2 mL après dilution pour les enfants de 6 mois à 4 ans.
- La posologie est d'une dose unique chez les personnes ayant déjà reçu un schéma de primo-vaccination contre la COVID-19 dont la dose la plus récente a été administrée au moins 3 mois auparavant. Chez les individus immunodéprimés des doses supplémentaires sont possibles.
- Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
- Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Comirnaty® Original.
- Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Comirnaty® Original.

Seul vaccin Comirnaty® encore disponible en France.

### 3. Spikevax® de Moderna

#### a. Vaccin original

Le principe actif de ce vaccin est l'élasoméran, un ARNm encapsulé dans des nanoparticules lipidiques et codant pour la protéine Spike entière du SRAS-CoV-2 avec les deux mêmes mutations d'acides aminés en proline (K986P et V987P) que dans le vaccin Comirnaty®, qui sont localisées dans l'hélice centrale. Ces mutations ont pour but de bloquer la conformation de la protéine de façon à ce que les molécules de l'immunité adaptative puissent s'y lier plus facilement [124].

Toutes les uridines de cet ARNm ont été remplacées par des 1-méthylpseudouridine pour augmenter la stabilité de l'ARN.

Cet ARNm est non-répliatif, il ne sera donc pas amplifié. Il est capé en 5' pour augmenter sa demi-vie et donc le nombre de protéines produites. Cette coiffe est ajoutée manière enzymatique pour obtenir une structure de CAP1 de mammifère normale. La séquence du 5'UTR n'a pas été dévoilée en dehors du motif riche en GC (CCCCGGCGCC) et le 3'UTR provient du gène humain de la b-globine. Cette séquence possède trois codons STOP et la séquence exacte du polyA n'a pas été dévoilée. Les NPL sont formées des mêmes lipides de soutien que pour Comirnaty® (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ou DSPC, de cholestérol et de sucrose), de lipides ionisables (SM-102) et de lipides furtifs (PEG2000-DMG). Le vaccin contient aussi du tampon Tris et des sels (*Figure 37*)[111]

Ce vaccin est disponible sous différentes formes : des flacons multidoses à 0,2 mg/mL pouvant donner 10 doses de 0,5 mL ou 20 doses de 0,25 mg/mL, des flacons multidoses à 0,1 mg/mL pouvant donner 5 doses de 0,5 mL ou 10 doses de 0,25 mg/mL et des seringues préremplies contenant 1 dose de 0,5 mL[124].

La posologie de ce vaccin est la suivante : 2 doses à 28 jours d'écart et une 3<sup>ème</sup> dose 28 jours après la 2<sup>nd</sup>e pour les sujets immunodéprimés. Les doses varient selon la population et selon la concentration du produit. Avec Spikevax® 0,2 mg/mL il faut des doses de 0,5 mL contenant 100 µg d'ARNm codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 pour les plus de 12 ans et des doses de 0,25 mL contenant 50 µg d'ARN pour les enfants de 6 à 11 ans. Avec Spikevax® 0,1 mg/mL et Spikevax® 50 µg en seringue préremplie, il faut des doses de 0,5 mL contenant 50 µg d'ARN pour les enfants de 6 à 11 ans et des doses de 0,25 mL contenant 25 µg d'ARN chez les enfants de 6 mois à 5 ans. Ce vaccin est administré par voie intramusculaire[124].

Les effets indésirables possibles de ce vaccin sont : douleur, rougeur et gonflement au point d'injection, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires, fièvre, nausées, réactions anaphylactiques[123]. De rares cas de myocardites et de péricardites chez des adolescents et des jeunes adultes ont été observés, surtout à la seconde dose[124].

Son efficacité en phase clinique était supérieure à 95% de protection contre la COVID-19 et est de 94,1% 14 jours après la deuxième dose chez les participants de plus de 18 ans, toutes tranches d'âge confondues. Il est à noter que l'efficacité décline chez les plus de 65 ans (86,4%)[124].

Ce produit peut être conservé 9 mois entre -50 et -15°C, 2 semaines entre -25° et -15°C, 30 jours entre 2-8°C, 24h entre 8° et 25°C [124].

Ce vaccin n'est plus disponible en France.

## **b. Vaccins prenant en compte la forme Omicron**

Pour lutter face à l'émergence du variant Omicron, Moderna a produit 3 autres vaccins :

- Spikevax® Bivalent Original/Omicron BA.1[124] :
  - o Une dose contient soit :
    - 25 µg d'élasoméran et 25 µg d'isomélasoméran (ARNm encapsulé dans des nanoparticules lipidiques et codant pour la protéine Spike entière du SRAS-CoV-2 Omicron BA.1). Disponible en flacons multidoses à (50 mg/50 mg)/mL de 2,5 mL ou de 5 mL, en flacon unidose à (25 mg/25 mg) de 0,5 mL ou de 5 mL ou en seringue préremplie à (25 mg/25 mg) de 0,5 mL.
    - 12,5 µg d'élasoméran et 12,5 µg d'isomélasoméran. Disponible en flacons multidoses à (50 mg/50 mg)/mL de 2,5 mL.
  - o La posologie est d'une dose de 0,5 mL chez les plus de 12 ans et d'une dose de 0,25 mL chez les 6 à 11 ans, avec un intervalle d'au moins 3 mois avec la dernière dose de vaccin contre la COVID-19.
  - o Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
  - o Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Spikevax® Original.

- Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Spikevax® Original.
- Ce vaccin n'est plus disponible en France.
- Spikevax® Bivalent Original/Omicron BA.4-5[124] :
  - Une dose contient soit :
    - 25 µg d'élasoméran et 25 µg de davésoméran (ARNm encapsulé dans des nanoparticules lipidiques et codant pour la protéine Spike entière du SRAS-CoV-2 Omicron BA.4-5). Disponible en flacons multidoses à (50 mg/50 mg)/mL de 2,5 mL ou de 5 mL, en flacon unidose à (25 mg/25 mg) de 0,5 mL ou en seringue préremplie à (25 mg/25 mg) de 0,5 mL.
    - 12,5 µg d'élasoméran et 12,5 µg de davésoméran. Disponible en flacons multidoses à (50 mg/50 mg)/mL de 2,5 mL.
  - La posologie est d'une dose de 0,5 mL chez les plus de 12 ans, avec un intervalle d'au moins 3 mois avec la dernière dose de vaccin contre la COVID-19. Chez les plus de 65 une dose supplémentaire peut-être administrée 3 mois après. Chez les enfants de 5 à 11 ans, la posologie est d'une dose de 0,25 mL avec un intervalle d'au moins 3 mois avec la dernière dose de vaccin contre la COVID-19. Chez les enfants de 6 mois à 4 ans la posologie est de 2 doses de 0,25 mL à 28 jours d'écart. Chez les sujets immunodéprimés, une ou des doses supplémentaires peuvent être administrées, au minimum 2 mois après la dernière dose de vaccin contre la COVID-19.
  - Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
  - Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Spikevax® Original.
  - Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Spikevax® Original.
  - Ce vaccin n'est plus disponible en France.
- Spikevax® XBB.1.5[124] :
  - Une dose contient soit :
    - 50 µg d'andusoméran (ARNm encapsulé dans des nanoparticules lipidiques et codant pour la protéine Spike entière du SRAS-CoV-2 Omicron XBB.1.5). Disponible en flacons multidoses à 0,1mg/mL de 2,5 mL, en flacon unidose de 0,5 mL ou en seringue préremplie de 0,5 mL.
    - 25 µg d'andusoméran. Disponible en flacons multidoses à 0,1mg/mL de 2,5 mL.



- La posologie est d'une dose de 0,5 mL chez les plus de 12 ans avec un intervalle d'au moins 3 mois avec la dernière dose de vaccin contre la COVID-19. Chez les plus de 65 une dose supplémentaire peut-être administrée 3 mois après. Chez les enfants de 5 à 11 ans, la posologie est d'une dose de 0,25 mL avec un intervalle d'au moins 3 mois avec la dernière dose de vaccin contre la COVID-19. Chez les enfants de 6 mois à 4 ans la posologie est de 2 doses de 0,25 mL à 28 jours d'écart en cas de primo-vaccination ou d'une dose de 0,25 mL en cas de vaccination antérieure. Chez les sujets immunodéprimés, une ou des doses supplémentaires peuvent être administrées, au minimum 2 mois après la dernière dose de vaccin contre la COVID-19.
- Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.
- Les effets indésirables sont similaires à ceux du vaccin Spikevax® Original.
- Les conditions de conservation sont identiques à celles du vaccin Spikevax® Original.
- Ce vaccin n'est plus disponible en France.

#### 4. Nuvaxovid® de Novavax

##### a. Vaccin original

Il s'agit d'un vaccin contenant la protéine Spike recombinante du SRAS-CoV-2, qui a été purifiée et stabilisée dans sa conformation de pré-fusion. Cette protéine recombinante est produite en utilisant un ADN recombinant avec un baculovirus dans une lignée cellulaire de cellules Sf9 de l'espèce *Spodoptera frugiperda*. L'adjuvant à base de saponine, Matrix-M, est ajouté pour faciliter l'activation du système immunitaire.

Ce vaccin est distribué sous forme de flacons multidoses contenant 5 ou 10 doses de 0,5 mL.

Une dose de 0,5 mL contient 5 µg de la protéine S, 42,5 mg de la fraction A de l'adjuvant Matrix-M et 7,5 mg de la fraction C de cet adjuvant.

La posologie de ce vaccin pour les personnes de plus de 12 ans est de 2 doses de 0,5 mL à 3 semaines d'intervalle suivie d'une dose de rappel 3 mois plus tard. Ce vaccin est administré par voie intramusculaire.

Les effets indésirables les plus fréquents sont les suivants : sensibilité au point d'injection, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires.

L'efficacité de ce vaccin 7 jours après la deuxième dose est de 90,4%.

Ce vaccin peut être conservé 12 mois entre 2 et 8°C[125].

## **b. Vaccin contre la souche Omicron**

Le vaccin Nuvaxovid® XBB.1.5 a été produit par Novavax suite à l'émergence de la souche Omicron du SRAS-CoV-2.

Ce vaccin est distribué sous forme de flacons multidoses contenant 5 doses de 0,5 mL. Une dose de 0,5 mL contient 5 µg de la protéine S du SRAS-CoV-2 XBB.1.5, 42,5 mg de la fraction A de l'adjuvant Matrix-M et 7,5 mg de la fraction C de cet adjuvant.

La posologie de ce vaccin pour les personnes de plus de 12 ans est d'une dose de 0,5 mL. Ce vaccin est administré par voie intramusculaire. Les effets indésirables sont les mêmes que pour le vaccin original. Ce vaccin peut être conservé 12 mois entre 2 et 8°C[125].

## **5. JCOVDEN® de Janssen**

Ce vaccin contient un adénovirus humain non-répliquatif de type 26 qui code pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2, produit grâce à de l'ADN recombinant dans une lignée cellulaire PER.C6 TetR.

Une dose de ce vaccin de 0,5 mL contient au minimum  $2,5 \times 10^{10}$  particules virales et environ 2 mg d'éthanol.

Ce produit est distribué en flacons multidoses contenant 5 doses chacun.

La posologie de ce vaccin pour les personnes de plus de 18 ans est d'une dose de 0,5 mL, injectée en intramusculaire, suivie d'une dose équivalente de rappel au moins 2 mois plus tard.

Les effets indésirables les plus fréquents sont les suivants : douleur, rougeur et gonflement au point d'injection, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires, fièvre, nausées. De rares cas de syndromes de Guillain-Barré et de trouble de la coagulation sanguine de type thrombose avec syndrome de thrombocytopénie, thromboembolie veineuse et de thrombocytopénie immunitaire ont été rapportés.

L'efficacité de ce vaccin contre les formes symptomatiques de la COVID-19 14 jours après la dose de rappel est de 75,2 % et contre les formes sévères elle est de 100%.

Les flacons peuvent être conservés 2 ans entre -25° et -15°C et jusqu'à 11 mois entre 2° et 8°C[126].

Janssen n'a pas produit de vaccin spécifique contre la souche Omicron du SRAS-CoV-2 mais une étude indépendante menée aux Etats-Unis, DMID-21-0012, a montré qu'un rappel avec JCOVDEN® au moins 12 semaines après une vaccination complète par Spikevax® ou Comirnaty® permettait d'améliorer les réponses en anticorps contre le variant Omicron BA.1.[126].

## **6. Vaxzevria® d'AstraZeneca**

Ce vaccin est composé d'un adénovirus de chimpanzé non-répliquatif codant pour la protéine Spike du SRAS-CoV-2 sans modifications de la séquence codante, produit grâce à de l'ADN recombinant dans une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines HEK293.

Une dose de ce vaccin de 0,5 mL contient au minimum  $2,5 \times 10^8$  unités infectieuses et environ 2 mg d'éthanol.

Ce produit est distribué en flacons multidoses contenant 8 ou 10 doses chacun.

La posologie de ce vaccin pour les personnes de plus de 18 ans est de 2 doses de 0,5 mL injectées en intramusculaire avec un intervalle de 4 à 12 semaines.

Les effets indésirables les plus fréquents sont les suivants : douleur, rougeur et gonflement au point d'injection, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires, fièvre, nausées. De très rares cas de thromboses avec un syndrome thrombopénique ont également été observés.

L'efficacité de ce vaccin contre la COVID-19 plus de 15 jours après la dose de rappel est de 59,5 %.

Les flacons peuvent être conservés 6 mois entre 2° et 8°C[127].

Comme Janssen, AstraZeneca n'a pas produit de vaccin spécifique contre la souche Omicron du SRAS-CoV-2 mais une étude menée au Royaume-Uni a démontré qu'un rappel avec Vaxzevria® après une vaccination complète permettait d'induire une protection de 66,1% contre une forme symptomatique de la maladie induite par le variant Omicron et d'éviter une hospitalisation dans 80,9% des cas[128].

## 7. Population vaccinée en France

D'après l'Assurance maladie, au 1<sup>er</sup> janvier 2023, 78,7% de la population française présentait un schéma vaccinal initial terminé, c'est-à-dire deux injections de vaccin, une seule injection de vaccin avec une infection à la Covid-19, une seule injection avec le vaccin JCOVDEN® ou trois injections pour les patients immunodéprimés[129]. Ceci représente environ 53,4 millions de personnes sur une population totale de 67 813 396 habitants.

L'analyse de la vaccination de la population française par type de vaccin pour la deuxième injection est la suivante (*Figure 38*) :

- 79,3% de ces individus, soit 42 335 800 patients ont été vaccinés avec le vaccin Comirnaty® de Pfizer-BioNTech
- 0,03% de ces individus, soit 15 690 patients ont été vaccinés avec le vaccin Comirnaty® Original/Omicron BA.5 de Pfizer-BioNTech
- 0,4%, soit 223 510 patients ont reçu le vaccin Comirnaty® pédiatrique de Pfizer-BioNTech
- 2,0%, soit 1 074 640 patients ont été vaccinés avec le vaccin JCOVDEN® de Janssen
- 11,5%, soit 6 133 070 patients ont été vaccinés avec le vaccin Spikevax® de Moderna
- 0,002%, soit 870 patients ont été vaccinés avec le vaccin Spikevax® de Moderna
- 0,03%, soit 16 730 patients ont reçu le vaccin Nuvaxovid® de Novavax
- 6,7%, soit 3 579 280 patients ont été vaccinés avec le vaccin Vaxzevria® d'AstraZeneca.

Les vaccins à ARNm représentent donc la grande majorité des vaccins administrés aux français depuis le début de la campagne de vaccination puisqu'ils représentent 91,2% des vaccins utilisés.

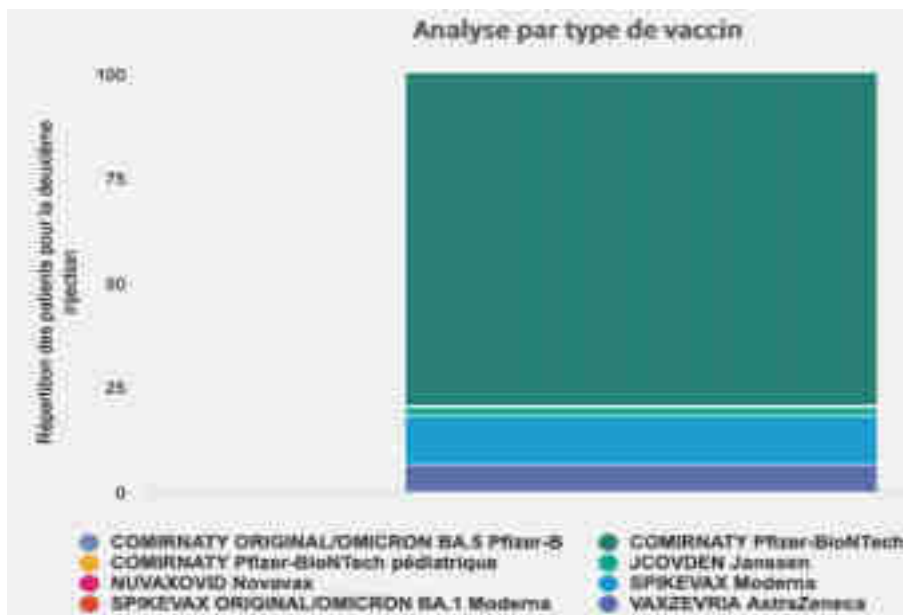


Figure 38 Représentation graphique de l'analyse de la vaccination de la population française par type de vaccin pour la 2<sup>ème</sup> injection au 1<sup>er</sup> janvier 2023 (dernière mise à jour). D'après <https://datavaccin-covid.ameli.fr/pages/type-vaccins/>. La majorité de la population (79,3%) a été vaccinée avec le vaccin Comirnaty de Pfizer-BioNTech pour la 2<sup>ème</sup> injection.

## 8. Production de vaccins à ARNm

Tandis que la production de vaccins classiques est longue et coûteuse, celle des vaccins à ARNm présente de nombreux avantages.

Plusieurs techniques sont utilisables pour la production des ARNm ainsi que pour leur purification.

La production d'ARNm par transcription *in vitro* débute généralement par le clonage de la séquence codant l'antigène cible à l'aide d'un plasmide. Ce plasmide est ensuite linéarisé puis transcrit *in vitro* en ARN à l'aide d'ARN polymérase. Les ARN produits *in vitro* sont différents de ceux produits chimiquement dont la séquence ne peut dépasser les 200 pb et pour lesquels le rendement décroît avec l'addition de chaque nucléoside qui se fait à l'aide de groupements chimiques protecteurs. Les ARN polymérase SP6, T3 et T7 issues de bactériophages sont souvent utilisées pour la transcription *in vitro*, la dernière étant la plus fréquemment employée. L'ARN polymérase T7 reconnaît la séquence d'ADN du promoteur T7 (TAATACGACTCACTATAGGGAGA) afin d'initier la transcription de l'ADN matrice qui suit. La séquence codant la protéine d'intérêt pour la transcription de l'ARN doit être placée juste après le promoteur T7 en commençant par la partie codant pour la région non-traduite en 5'. Bien qu'efficace, la transcription *in vitro* à l'aide de l'ARN polymérase T7 a des limites. Le rendement est moins bon si la séquence codante contient peu de guanines en 5', l'extrémité 3' peut être hétérogène avec l'addition d'un ou deux nucléotides supplémentaires à cause d'une terminaison incomplète de la transcription et enfin, la synthèse d'ARN double brin non-spécifiques due à une élongation erronée en

3' peut conduire à une réponse inflammatoire et immunitaire innée car ce type d'ARN est reconnu comme le signe d'une infection virale. La séquence du promoteur de l'ARN polymérase T3 étant proche de celle du promoteur T7 (AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA), les deux enzymes peuvent synthétiser de l'ARN en reconnaissant le promoteur de l'autre, mais l'efficacité s'en trouve diminuée d'environ 90%. L'ARN polymérase SP6 reconnaît quant à elle une séquence différente (ATTTAGGTGACACTATAG). La transcription *in vitro* d'ARNm par une de ces enzymes permet d'obtenir tous les éléments d'un ARNm natif mis à part la coiffe en 5'. Cette coiffe peut être ajoutée en même temps que la transcription *in vitro* en remplaçant une partie du GTP par un analogue de la coiffe de type m<sup>7</sup>GpppG ou en ajoutant une étape au processus au cours de laquelle des enzymes de coiffe dérivées de virus sont utilisées pour synthétiser la coiffe. Dans ce cas il faut cependant ajouter une étape de purification pour enlever les enzymes et les réactifs utilisés pour la coiffe (*Figure 39*)[130]-[131]. Cette seconde technique reste plus efficace (100% contre 60-80% pour le capping à l'aide des analogues)[131] et plus rentable que la première, notamment en raison du coût des analogues de capping, mais rallonge le temps de production des ARNm.

La transcription *in vitro* d'ARN ne requérant pas de cellules, il n'est pas nécessaire de valider l'absence d'impuretés cellulaires et la validation pour la production à grande échelle s'en trouve simplifiée par rapport aux produits provenant de systèmes biologiques[130]. La production d'ARN ainsi que l'addition de la coiffe forme la partie « upstream » du processus. La partie « downstream » correspond quant à elle à la purification, à la concentration et à la stérilisation du produit.

Les ARNm produits doivent être purifiés afin d'éliminer les enzymes, les nucléotides restants, l'ADN matrice ou encore les ARN tronqués ayant été produits. Cette étape de purification fait généralement appel à de la chromatographie. La chromatographie d'exclusion stérique est la première à avoir été décrite pour la purification à grande échelle d'ARNm synthétiques, puis d'autres méthodes telles que la chromatographie en phase inverse, la chromatographie à échange d'ions, la chromatographie d'affinité ou la chromatographie en phase liquide ont été testées (*Figure 39*)[131], [132].

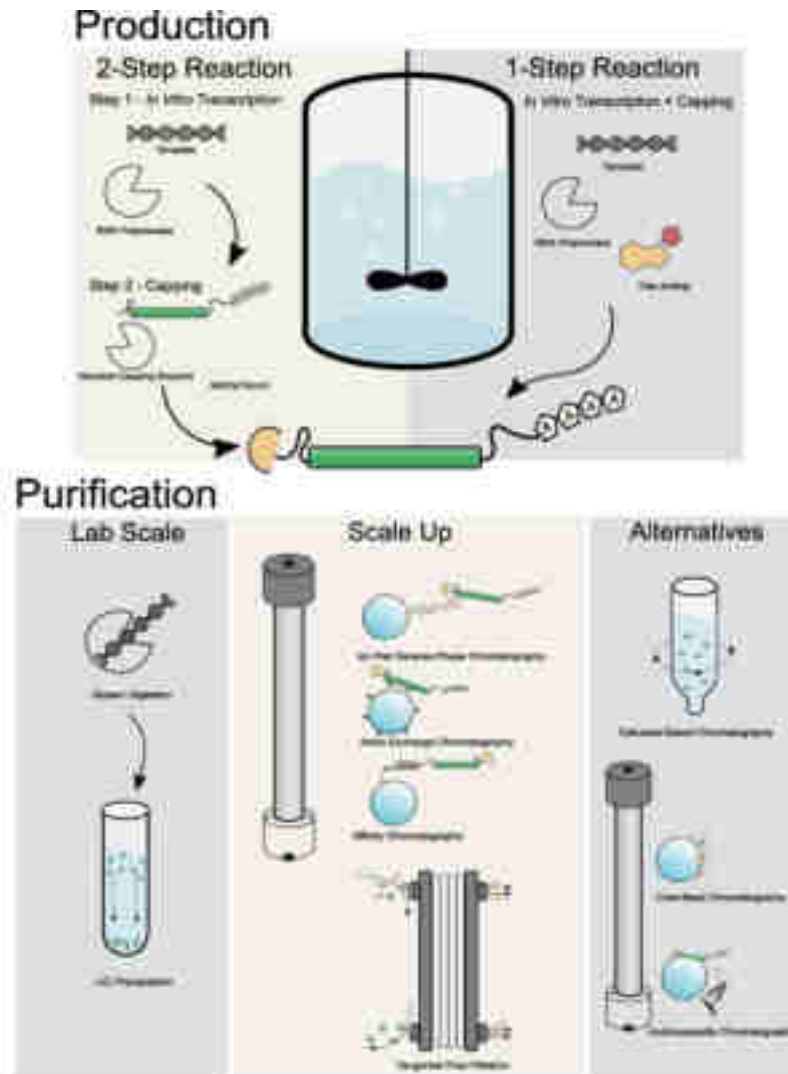


Figure 39 Étapes de production et de purification du processus de fabrication des vaccins à ARNm. D'après « mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks », Sara Sousa Rosa, 2021. Représentation schématique de la production d'ARNm à l'aide d'une réaction enzymatique à une étape (comme dans le cas du vaccin Comirnaty® de Pfizer/BioNTech), utilisant un analogue de capping, ou en deux étapes (comme dans le cas du vaccin Spikevax® de Moderna), à l'aide d'une enzyme de capping (ici l'enzyme du virus de la vaccine ou VCC). La purification de l'ARNm à l'échelle d'un laboratoire se fait par digestion avec une DNase I suivie d'une précipitation. À plus grande échelle, la purification fait appel à des techniques de chromatographie et de filtration telles que la chromatographie en phase inverse à paire d'ions, la chromatographie d'échange d'anions, la chromatographie d'affinité ou la filtration à flux tangential. Des alternatives telles que la chromatographie à base de cellulose, la chromatographie à base de noyau ou la chromatographie sur hydroxyapatite peuvent aussi être utilisées.

## 9. Les vaccins à ARNm contre la COVID-19, une mise sur le marché exceptionnellement rapide

En temps normal, le développement d'un vaccin prend en moyenne 7 à 10 ans[133]. Les vaccins à ARNm contre la COVID-19, sont quant à eux arrivés sur le marché en environ 1 an. Par exemple, les résultats pré-cliniques du vaccin Comirnaty® ont été publiés en octobre 2020 et il a reçu son autorisation de mise sur le marché européenne conditionnelle le 21 décembre 2020[134], [135]. L'arrivée

particulièrement rapide de ces vaccins sur le marché est due à la fois aux recherches menées dans ce domaine depuis environ 30 ans, à des caractéristiques qui leur sont propres telles que leurs bons résultats dans les phases précoces des essais cliniques, leur rapidité de conception et de production à grande échelle, mais aussi au contexte très particulier de l'épidémie de SRAS-CoV-2 (*Figure 40*). En effet, la sévérité de la pandémie ainsi que l'urgence à lutter contre cette dernière a permis la réalisation concomitante des différentes phases des essais cliniques précédant la mise sur le marché et a donné lieu à des procédures d'enregistrement accélérées auprès des autorités compétentes telles que l'Agence européenne des médicaments (EMA)[136]. Dans le cadre la gestion de la pandémie de COVID-19 l'EMA a mis en place un comité spécial appelé COVID-19 EMA pandemic Task Force (COVID-TEF). Ce comité a pour but d'aider le comité des médicaments à usage humain et le comité pour l'évaluation des risques en matière de pharmacovigilance dans la révision continue des données des vaccins alors qu'ils sont encore en développement et avant qu'une demande d'AMM ne soit déposée. Cette révision continue concerne les données de qualité, les résultats d'efficacité et les premières données de sécurité au fur et à mesure de leur disponibilité et a pour but de réduire les délais d'évaluation. Les données du vaccin sont aussi évaluées dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché conditionnelle. Ce type d'autorisation est accordée pour des produits dont les bénéfices sont évalués comme étant supérieurs aux risques après examen des données démontrant la qualité, l'efficacité et l'innocuité du vaccin tout en assurant la surveillance du médicament après sa mise sur le marché. L'autorisation conditionnelle ne doit pas être confondue avec une autorisation d'urgence qui autorise l'utilisation d'un médicament de façon temporaire mais sans permettre sa mise sur le marché[137].

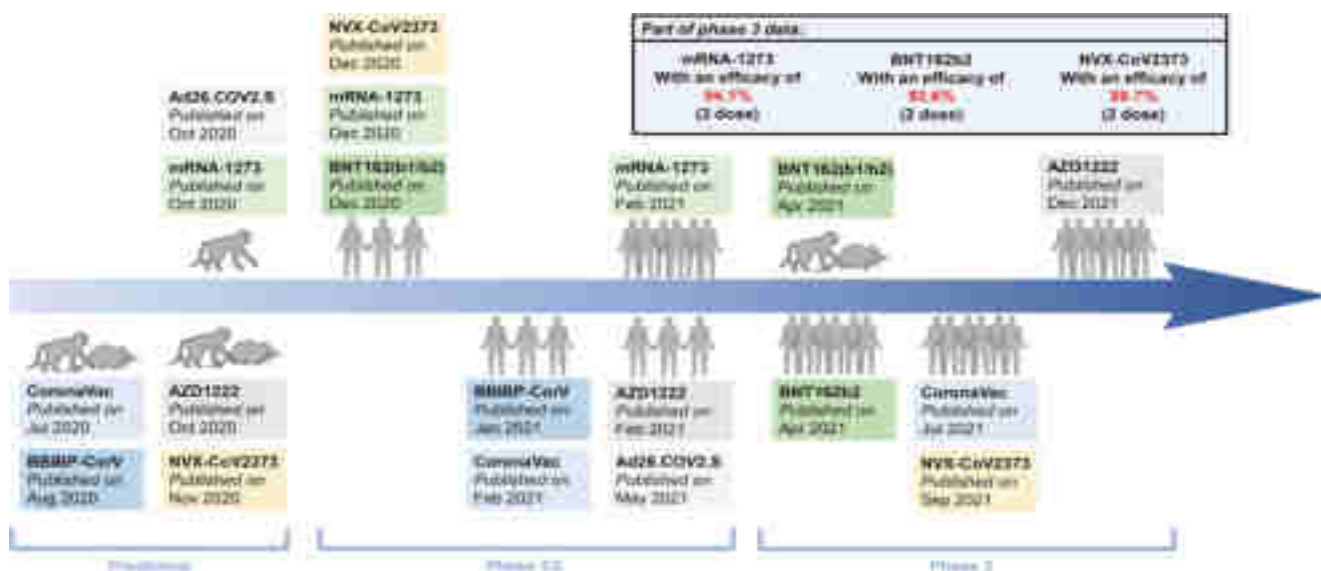


Figure 40 Frise chronologique des essais pré-cliniques et cliniques des vaccins approuvés par l'OMS contre la COVID-19. D'après « COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects », de M. Li et al., publié le 3 mai 2022. Frise chronologique représentant les dates de publication des résultats des essais pré-cliniques puis cliniques des différents vaccins approuvés par l'OMS contre la COVID-19 ainsi que l'efficacité observée en phase III pour les vaccins Comirnaty®, Spikevax® et Nuvaxovid®.

#### IV. Conclusion

Les vaccins à ARNm sont étudiés depuis près de 30 ans, à la fois dans un but curatif pour élargir l'arsenal thérapeutique contre les cancers et dans un but prophylactique pour lutter contre les infections virales ou bactériennes. Les vaccins à ARNm présentent différents avantages.

La standardisation qui est possible en ayant recours à des ARNm transcrits *in vitro* permet de réduire le coût de la production et de la purification du vaccin, et de diminuer la durée de production, permettant ainsi une meilleure adaptation à la demande, comme dans le cas de la COVID-19 avec la possibilité d'adapter le vaccin rapidement en cas de mutation du virus. Leur production est aussi accélérée par le fait qu'ils ne nécessitent ni œufs de poules, comme le vaccin contre la grippe, ni cellules de mammifères, ce qui permet de s'affranchir des étapes de cultures mais aussi de réduire le risque de contamination des vaccins ainsi que la présence d'allergènes.

La réduction des coûts de production joue elle aussi un rôle important dans l'espoir soulevé par ces nouveaux vaccins. Cela pourrait faciliter l'accès à la vaccination de certaines populations à faibles revenus, permettant ainsi une lutte plus efficace contre les maladies contagieuses aux niveau mondial[109].

Les vaccins à ARNm peuvent aussi offrir une couverture plus efficace en contenant plusieurs séquences d'ARNm séparées ou en les combinant en une seule séquence plus grande, entraînant ainsi l'immunisation du patient contre différents épitopes.



L'activation concomitante par ces vaccins de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire augmente aussi leur efficacité.

Le fait qu'ils ne contiennent pas de pathogènes vivants est un de leurs autres atouts, il n'y a donc pas de risques d'induire la maladie, même chez les sujets les plus fragiles.

Leur caractère sécurisé s'appuie aussi sur leur incapacité à s'intégrer au génome de l'hôte, ce qui est un risque avec les vaccins à ADN, et sur leur dégradation rapide dans l'organisme.

Les premières études menées sur les vaccins à ARNm ont aussi démontré une bonne tolérance de ces vaccins chez les sujets vaccinés.

Bien que le capping et la congélation des vaccins à ARNm à -80°C permettent de maintenir leur stabilité pendant environ 1 an, cela reste un point faible de ce type de vaccin, une chaîne du froid de cette ampleur étant difficile à maintenir tout au long de l'acheminement des doses. La stabilité des vaccins à ARNm est particulièrement menacée par l'omniprésence de RNases.

Cependant la stabilité modérée de l'ARNm une fois injecté au patient peut s'avérer utile, n'entraînant ainsi qu'une expression transitoire des protéines correspondantes afin d'éviter des réactions inflammatoires trop importantes, tout en gardant la possibilité de prolonger la production de protéines dans les cas le nécessitant, notamment en se tournant vers les ARNm autorépliquatifs ou en jouant sur l'encapsulation des ARNm.

L'incapacité des ARNm à s'intégrer à l'ADN de l'hôte par eux-mêmes leur confère un avantage par rapport aux vaccins à ADN, facilitant aussi leur mise sur le marché puisqu'ils ne sont pas considérés comme des thérapies géniques aux regards de la loi. De plus, ce type de vaccin est aussi considéré comme sûr en raison de son caractère non-infectieux. Ils peuvent ainsi être utilisés chez des patients immunodéprimés.

## **V. Discussion**

### **1. Comparaison avec les vaccins à ADN**

Suite à des études des années 90 prouvant l'induction d'une réponse immunitaire suite à l'utilisation d'ADN sous forme de plasmides ou de vecteurs viraux, les vaccins à ADN ont longtemps été préférés aux vaccins à ARN notamment en raison de leur stabilité supérieure que leur confère leur structure bicaténaire. Ces deux outils présentent des caractéristiques similaires telles que l'absence de risque de développer la maladie, un développement rapide, la possibilité de formuler des vaccins multivalents et l'induction d'une forte réponse des cellules T.

Les vaccins à ADN s'avèrent plus stables tandis que les vaccins à ARN ne présentent pas de risques d'intégration au génome de l'hôte (*Figure 41*).

Bien que proches, ces 2 techniques ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients, c'est pourquoi elles restent toutes deux des pistes d'avenir complémentaires pour la prévention ou le traitement de certaines maladies.

	Vaccins à ADN	Vaccins à ARNm
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-infectieux</li> <li>• Développement rapide</li> <li>• Production standardisée possible</li> <li>• Possibilité de vaccins multivalents</li> <li>• Forte réponse des cellules T</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-infectieux</li> <li>• Dégradable rapidement par l'organisme</li> <li>• Pas de risque d'intégration au génome de l'hôte</li> <li>• Développement rapide</li> <li>• Production standardisée</li> <li>• Production sans produits dérivés d'animaux</li> <li>• Possibilité de vaccins multivalents</li> <li>• Réponse puissante de l'immunité innée</li> <li>• Forte réponse des cellules T</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible immunogénicité</li> <li>• Potentiel risque d'intégration au génome de l'hôte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problèmes de stabilité dus aux RNases</li> <li>• Conservation des produits</li> <li>• Réactions indésirables dues à l'inflammation</li> <li>• Coûts de production encore élevés, bien qu'en diminution</li> </ul>

Figure 41 Tableau comparatif des avantages et des inconvénients des vaccins à ADN et à ARNm. D'après « Enlisting the mRNA vaccine Platform to combat parasitic infections », Versteeg et al., 2019.

## 2. Quel avenir pour les vaccins à ARNm ?

### a. Les vaccins à l'étude

L'utilisation des vaccins à ARNm est envisagée pour des maladies contre lesquelles nous n'avons pas encore de vaccins ou pour celles dont les vaccins disponibles sont peu efficaces. Par exemple, des vaccins pour lutter contre le virus de la grippe permettraient une réponse plus rapide que la production habituelle de vaccins qui est basée sur des prédictions faites plusieurs mois à l'avance et donc peu fiable[138].

Le 31.12.2019 il y avait 64 essais cliniques déclarés portant sur les vaccins à ARNm. Le 19.10.2022, il y en avait 424 et au 16.07.2024, il y en a 555, ce qui démontre bien l'intérêt croissant pour cette technique. Parmi les vaccins à ARN aujourd'hui à l'étude se trouvent des candidats pour lutter contre les infections virales comme le VIH et Zika, les infections bactériennes telles que le pneumocoque ou la tuberculose, les infections parasitaires comme le paludisme, les cancers de type adénocarcinome, leucémie ou lymphome, les maladies auto-immunes telles que le lupus systémique érythémateux, l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques et les maladies métaboliques comme le diabète.

L'augmentation du nombre d'essais cliniques portant sur les vaccins à ARN est un phénomène mondial bien que la majorité de ces essais soit concentrée dans l'hémisphère Nord.

La majorité de ces candidats vaccins sont encore aux phases précoces d'essais cliniques. En effet, 170 de ces essais sont encore en phase I et 169 en phase II, contre seulement 79 en phase III et 35 en phase IV, qui portent tous sur les vaccins contre la COVID-19.

Les vaccins à ARNm représentent aussi un espoir dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer. Les vaccins à ARNm étudiés dans le cadre de la cancérologie ont pour but d'éduquer le système immunitaire du patient afin qu'il s'oppose de façon plus efficace à la croissance des cellules cancéreuses et à la récurrence des cancers et qu'il détruise les cellules restantes après d'autres traitements[139] anticancéreux.

L'immunothérapie consiste à agir sur le système immunitaire du patient afin d'améliorer sa capacité à lutter contre une maladie[140]. De ce point de vue les vaccins peuvent être considérés comme une sorte d'immunothérapie.

Dans le cas du cancer du col de l'utérus, différents vaccins ont été testés. Cependant, dans la majorité des cas, leur puissance s'est avérée décevante. Une des explications à ce problème est le manque de modèles murins pour ce type de cancers, les études précliniques se faisant donc souvent sur des tumeurs ectopiques (modèles d'implantation sous-cutanée de tumeurs), or la localisation de la tumeur est un facteur important quand il s'agit de tester l'efficacité des vaccins. Il a été démontré que la corrélation entre les infections à HPV et les cancers du col de l'utérus est plus forte que celle entre les cancers du poumon et le fait de fumer ou que celle entre les infections par le virus de l'hépatite B et les cancers du foie[141], [142]. Les souches HPV16 et 18 sont oncogènes *via* les protéines E6 et 7 qu'elles expriment. La protéine E6 promeut la prolifération cellulaire en stimulant la dégradation de la protéine p53 *via* la formation d'un complexe trimérique comprenant E6, p53 et E6-AP qui est une enzyme d'ubiquitination cellulaire. Or, p53 est un suppresseur de tumeur qui une fois complexé de cette manière ne peut plus contrôler le cycle cellulaire. E7 se fixe sur une autre protéine suppresseur de tumeur, la protéine du rétinoblastome (pRB), empêchant l'interaction entre la pRB et les facteurs de transcription de la famille E2F. Cette interaction ayant pour but de réprimer l'expression de gènes codant pour des enzymes de réplication, son blocage entraîne une stimulation de la réplication et de la division cellulaire[143].

Le vaccin à ARNm E7-TriMix, codant pour la protéine oncogène E7 a montré des résultats encourageants. En effet, ce dernier induit la migration de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> vers la tumeur, permettant ainsi de contrôler sa croissance, et vers la rate. Ce vaccin induit des réponses mémoire à long terme, permettant ainsi de prévenir les rechutes et de limiter la formation de métastases[144]. L'impact de la localisation de la tumeur sur l'efficacité thérapeutique du vaccin a été confirmé en utilisant des modèles tumoraux orthotopiques de tumeurs pulmonaires et du tractus génital, l'efficacité étant supérieure sur les tumeurs pulmonaires, en raison notamment du nombre plus faible de lymphocytes T régulateurs dénombrés. En effet, le rôle des LT régulateurs est de maintenir une tolérance périphérique afin de prévenir les maladies auto-immunes, mais ils sont aussi impliqués dans les réponses allergiques, les

maladies infectieuses et les cancers afin d'éviter un emballement du système immunitaire[145]. Dans certains cas cependant, ils limitent aussi l'effet de certaines thérapies, comme décrit précédemment. En cas d'immunisation des souris et de traitement au cisplatine, une régression complète de la tumeur a été observée chez 88% des souris. En plus de son effet antimitotique, des effets immunomodulateurs du cisplatine ont été décrits, permettant ainsi de diminuer le nombre de lymphocytes T régulateurs présents au niveau de la tumeur, ce qui n'était pas le cas dans les tumeurs du tractus génital avec seulement l'immunisation par le vaccin.

### **b. Les défis des vaccins à ARNm**

La mise sur le marché des premiers vaccins à ARN ne signifie pas pour autant que la technique ait été optimisée au maximum. De nombreux points peuvent encore être améliorés afin de rendre ces vaccins plus efficaces et de pouvoir élargir leur champ d'utilisation.

Les ARNm sont des grandes molécules rapidement dégradées, nécessitant d'être conservées à des températures très basses[138], [139]. Ces molécules doivent donc être stabilisées et protégées afin d'être utilisées. Une amélioration de leur stabilité faciliterait aussi la distribution de ces vaccins en s'affranchissant d'une chaîne du froid à -80°C qui s'avère être un défi logistique en elle-même. L'adressage de l'ARNm directement aux CD ou le ciblage de certains types cellulaires permettrait un meilleur contrôle de l'effet des vaccins. L'augmentation du ratio  $\frac{\text{quantité d'ARN injecté}}{\text{quantité de protéines produites}}$  permet d'améliorer l'efficacité du vaccin tout en lui permettant d'être mieux toléré. Pour ce faire, il faut réguler la recapture de l'ARNm par les endosomes, augmenter la quantité de protéines traduites et dans certains cas la durée sur laquelle ces protéines seront traduites.

Pour ce qui est de la production, plus la synthèse et la purification de ces molécules et des réactifs nécessaires pourront être standardisées tout en respectant les bonnes pratiques de fabrication, plus les coûts de fabrication diminueront permettant ainsi l'accès à ces nouvelles technologies à des pays en voie de développement, ce qui, dans le cas de maladies contagieuses, aura pour impact d'améliorer la protection des populations au niveau mondial.

L'amélioration de ces différents points permettra d'optimiser l'efficacité, la sécurité, la stabilité et le coût de fabrication de ces vaccins.

Les réactions allergiques causées par les vaccins doivent elles aussi être réduites au minimum afin de pouvoir élargir les populations cibles, tout en sachant que la proportion de personnes ayant développé des IgM anti-PEG dans la population est passée de 0,2 à 4,9% en 1984 à environ 72% en 2016[146].

## **Bibliographie**

- [1] W. S. Klug, M. R. Cummings, C. A. Spencer, S. M. Ward, and L. Blottière, *Génétique*. Paris: Pearson education, 2006.
- [2] ‘Marc J Ostro, Devon Park Bioventures: Profile and Biography’, Bloomberg.com. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://www.bloomberg.com/profile/person/1495755>
- [3] M. J. Ostro, D. Giacomoni, D. Lavelle, W. Paxton, and S. Dray, ‘Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposomemediated insertion into a human cell line’, *Nature*, vol. 274, no. 5674, pp. 921–923, Aug. 1978, doi: 10.1038/274921a0.
- [4] G. J. Dimitriadis, ‘Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes’, *Nature*, vol. 274, no. 5674, pp. 923–924, Aug. 1978, doi: 10.1038/274923a0.
- [5] ‘Paul Krieg | Molecular and Cellular Biology’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://mcb.arizona.edu/profile/paul-krieg>
- [6] ‘Douglas A. Melton, Ph.D.’ Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://hsci.harvard.edu/people/douglas-melton-phd>
- [7] P. A. Krieg and D. A. Melton, ‘Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs’, *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, no. 18, pp. 7057–7070, Sep. 1984, doi: 10.1093/nar/12.18.7057.
- [8] D. A. Melton, P. A. Krieg, M. R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn, and M. R. Green, ‘Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter’, *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, no. 18, pp. 7035–7056, Sep. 1984, doi: 10.1093/nar/12.18.7035.
- [9] R. W. Malone, P. L. Felgner, and I. M. Verma, ‘Cationic liposome-mediated RNA transfection’, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 16, pp. 6077–6081, Aug. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.16.6077.
- [10] G. F. J. S. U. J. | F. · I. of AnatomyPhD, ‘Gustav JIRIKOWSKI | Professor (Full) | PhD | Friedrich Schiller University Jena, Jena | FSU | Institute of Anatomy’, ResearchGate. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/profile/Gustav-Jirikowski-2>
- [11] G. F. Jirikowski, P. P. Sanna, D. Maciejewski-Lenoir, and F. E. Bloom, ‘Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA’, *Science*, vol. 255, no. 5047, pp. 996–998, Feb. 1992, doi: 10.1126/science.1546298.
- [12] ‘Executive Director’, IMI Innovative Medicines Initiative. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <http://www.imi.europa.eu/about-imi/governance/executive-director>
- [13] F. Martinon *et al.*, ‘Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA’, *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1719–1722, Jul. 1993, doi: 10.1002/eji.1830230749.

- [14] ‘Eli Gilboa, Ph.D. | University of Miami Health System’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://umiamihealth.org/sylvester-comprehensive-cancer-center/research/faculty/eli-gilboa-phd>
- [15] D. Boczkowski, S. K. Nair, D. Snyder, and E. Gilboa, ‘Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo’, *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 2, pp. 465–472, Aug. 1996, doi: 10.1084/jem.184.2.465.
- [16] ‘Ingmar Hoerr’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://innoenterprisebucharest2019.eu/speakers/ingmar-hoerr.html>
- [17] I. Hoerr, R. Obst, H. G. Rammensee, and G. Jung, ‘In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies’, *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2000, doi: 10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#.
- [18] ‘Katalin Kariko, PhD profile | PennMedicine.org’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://www.pennmedicine.org/providers/profile/katalin-kariko>
- [19] ‘Drew Weissman, MD, PhD profile | PennMedicine.org’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://www.pennmedicine.org/providers/profile/drew-weissman>
- [20] K. Karikó, H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman, ‘mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3’, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12542–12550, Mar. 2004, doi: 10.1074/jbc.M310175200.
- [21] K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, and D. Weissman, ‘Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA’, *Immunity*, vol. 23, no. 2, pp. 165–175, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- [22] *Atlas d’immunologie: de la détection du danger à l’immunothérapie*. in Sciences sup. Malakoff: Dunod, 2018.
- [23] L. A. J. O’Neill, D. Golenbock, and A. G. Bowie, ‘The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity’, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 453–460, Jun. 2013, doi: 10.1038/nri3446.
- [24] ‘Derrick J. Rossi, PhD’. Accessed: Dec. 28, 2021. [Online]. Available: <https://hsci.harvard.edu/people/derrick-j-rossi-phd>
- [25] L. Warren *et al.*, ‘Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA’, *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 618–630, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012.
- [26] ‘Vaccins et vaccinations · Inserm, La science pour la santé’, Inserm. Accessed: Aug. 26, 2022. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/dossier/vaccins-et-vaccinations/>
- [27] ‘Vaccins et vaccination’. Accessed: Aug. 26, 2022. [Online]. Available: <https://www.who.int/fr/health-topics/vaccines-and-immunization>

- [28] S. Riedel, 'Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination', *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.*, vol. 18, no. 1, pp. 21–25, Jan. 2005.
- [29] E. Canouï and O. Launay, 'Histoire et principes de la vaccination', *Rev. Mal. Respir.*, vol. 36, no. 1, pp. 74–81, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.rmr.2018.02.015.
- [30] B. Greenwood, 'The contribution of vaccination to global health: past, present and future', *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1645, p. 20130433, Jun. 2014, doi: 10.1098/rstb.2013.0433.
- [31] 'Notre Histoire', Institut Pasteur. Accessed: Oct. 18, 2023. [Online]. Available: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire?language=fr>
- [32] 'History of vaccination | PNAS'. Accessed: Nov. 21, 2022. [Online]. Available: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1400472111>
- [33] L. Bastide, 'La vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) en France, ou pourquoi ses limites pourraient la conduire à une modification de sa politique d'application vaccinale', 2004.
- [34] T. Hsu *et al.*, 'The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 21, pp. 12420–12425, Oct. 2003, doi: 10.1073/pnas.1635213100.
- [35] 'Vaccins d'hier à aujourd'hui'. Accessed: Oct. 18, 2023. [Online]. Available: <https://vaccination-info-service.fr/Generalites-sur-les-vaccinations/Histoire-de-la-vaccination/Vaccins-d-hier-a-aujourd-hui>
- [36] M. Theiler and H. H. Smith, 'THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION', *J. Exp. Med.*, vol. 65, no. 6, pp. 787–800, May 1937, doi: 10.1084/jem.65.6.787.
- [37] onufrance, 'Vaccination : une longue histoire', ONU France. Accessed: Oct. 18, 2023. [Online]. Available: <https://unric.org/fr/vaccination-une-longue-histoire/>
- [38] J. E. Salk, H. E. Pearson, P. N. Brown, and T. Francis, 'PROTECTIVE EFFECT OF VACCINATION AGAINST INDUCED INFLUENZA B 1', *J. Clin. Invest.*, vol. 24, no. 4, pp. 547–553, Jul. 1945.
- [39] S. Y. Tan and N. Ponstein, 'Jonas Salk (1914–1995): A vaccine against polio', *Singapore Med. J.*, vol. 60, no. 1, pp. 9–10, Jan. 2019, doi: 10.11622/smedj.2019002.
- [40] J. Tobin, 'The First Flu Shot', University of Michigan Heritage Project. Accessed: Oct. 18, 2023. [Online]. Available: <https://heritage.umich.edu/stories/the-first-flu-shot/>
- [41] 'Poliomyelitis'. Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>

- [42] ‘Poliomyelitis (polio)’. Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/health-topics/poliomyelitis>
- [43] ‘Comment les vaccins sont-ils développés?’ Accessed: Aug. 27, 2022. [Online]. Available: <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/how-are-vaccines-developed>
- [44] C. for B. E. and Research, ‘Thimerosal and Vaccines’, *FDA*, Sep. 2022, Accessed: Nov. 22, 2022. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines>
- [45] ‘Adjuvants and Vaccines | Vaccine Safety | CDC’. Accessed: Nov. 22, 2022. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html>
- [46] ‘Vaccine ingredients | Vaccine Knowledge’. Accessed: Nov. 22, 2022. [Online]. Available: <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/vaccine-ingredients>
- [47] J. Tang *et al.*, ‘Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials’, *Viruses*, vol. 14, no. 2, p. 239, Jan. 2022, doi: 10.3390/v14020239.
- [48] J. Femel *et al.*, ‘Therapeutic vaccination against fibronectin ED-A attenuates progression of metastatic breast cancer’, *Oncotarget*, vol. 5, no. 23, pp. 12418–12427, Oct. 2014.
- [49] S. Kim *et al.*, ‘A phase II study of chemotherapy in combination with telomerase peptide vaccine (GV1001) as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer’, *J. Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 1363–1369, 2022, doi: 10.7150/jca.70385.
- [50] M. Rebucci-Peixoto *et al.*, ‘A Phase II Study Evaluating the Interest to Combine UCPVax, a Telomerase CD4 TH1-Inducer Cancer Vaccine, and Atezolizumab for the Treatment of HPV Positive Cancers: VolATIL Study’, *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 957580, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.957580.
- [51] E. B. Ellingsen *et al.*, ‘Durable and dynamic hTERT immune responses following vaccination with the long-peptide cancer vaccine UV1: long-term follow-up of three phase I clinical trials’, *J. Immunother. Cancer*, vol. 10, no. 5, p. e004345, May 2022, doi: 10.1136/jitc-2021-004345.
- [52] L. Teixeira *et al.*, ‘A First-in-Human Phase I Study of INVAC-1, an Optimized Human Telomerase DNA Vaccine in Patients with Advanced Solid Tumors’, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 26, no. 3, pp. 588–597, Feb. 2020, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1614.
- [53] C. L. Trimble *et al.*, ‘Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial’, *Lancet Lond. Engl.*, vol. 386, no. 10008, pp. 2078–2088, Nov. 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00239-1.



- [54] C. Aggarwal *et al.*, ‘Safety and Efficacy of MEDI0457 plus Durvalumab in Patients with Human Papillomavirus-Associated Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma’, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 560–570, Feb. 2023, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1987.
- [55] A. Albarran Y Carvajal *et al.*, ‘MVA E2 recombinant vaccine in the treatment of human papillomavirus infection in men presenting intraurethral flat condyloma: a phase I/II study’, *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.*, vol. 21, no. 1, pp. 47–59, 2007, doi: 10.2165/00063030-200721010-00006.
- [56] O. R. Cabo Beltran and R. Rosales Ledezma, ‘MVA E2 therapeutic vaccine for marked reduction in likelihood of recurrence of respiratory papillomatosis’, *Head Neck*, vol. 41, no. 3, pp. 657–665, Mar. 2019, doi: 10.1002/hed.25477.
- [57] R. Rosales *et al.*, ‘Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine’, *Hum. Gene Ther.*, vol. 25, no. 12, pp. 1035–1049, Dec. 2014, doi: 10.1089/hum.2014.024.
- [58] J. A. Sosman and V. K. Sondak, ‘Melacine: an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine’, *Expert Rev. Vaccines*, vol. 2, no. 3, pp. 353–368, Jun. 2003, doi: 10.1586/14760584.2.3.353.
- [59] ‘Melacine - an overview | ScienceDirect Topics’. Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/melacine>
- [60] ‘Glatiramère : substance active à effet thérapeutique’, VIDAL. Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/glatiramere-21887.html>
- [61] J. Kipnis and M. Schwartz, ‘Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders’, *Trends Mol. Med.*, vol. 8, no. 7, pp. 319–323, Jul. 2002, doi: 10.1016/s1471-4914(02)02373-0.
- [62] ‘Développement du médicament · Inserm, La science pour la santé’, Inserm. Accessed: Aug. 27, 2022. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/dossier/medicament-developpement/>
- [63] ‘Le développement du médicament’. Accessed: Aug. 27, 2022. [Online]. Available: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-circuit-du-medicament/article/le-developpement-du-medicament>
- [64] ‘Conception et développement du médicament - Médicaments’, Manuels MSD pour le grand public. Accessed: Aug. 27, 2022. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/m%C3%A9dicaments/pr%C3%A9sentation-des-m%C3%A9dicaments/conception-et-d%C3%A9veloppement-du-m%C3%A9dicament>
- [65] ‘Immune Correlates of Protection: A Vaccine’s Biological Benchmark’, Charles River. Accessed: Mar. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.criver.com/eureka/immune-correlates-protection-vaccines-biological-benchmark>

- [66] ‘Human challenge trials for vaccine development: regulatory considerations, Annex 10, TRS No 1004’. Accessed: Mar. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/human-challenge-trials-for-vaccine-a10-trs-no-1004>
- [67] ‘COVID-19 Challenge Study (COV-CHIM 01) | Trials - Oxford Vaccine Group’. Accessed: Mar. 09, 2023. [Online]. Available: <https://trials.ovg.ox.ac.uk/trials/covid-19-challenge-study-cov-chim-01>
- [68] ‘Volunteers needed for human challenge trial to study immune response to Covid-19 | University of Oxford’. Accessed: Mar. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.ox.ac.uk/news/2022-01-27-volunteers-needed-human-challenge-trial-study-immune-response-covid-19>
- [69] ‘PRIORIX’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/priorix-40831.html>
- [70] ‘M-M-RVAXPRO’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/m-m-rvaxpro-29341.html>
- [71] ‘VACCIN BCG AJVACCINES’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/vaccin-bcg-ajvaccines-88428.html>
- [72] A. J. Pollard and E. M. Bijker, ‘A guide to vaccinology: from basic principles to new developments’, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 2, pp. 83–100, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41577-020-00479-7.
- [73] ‘Vaccins vivants atténués’. Accessed: Jan. 07, 2022. [Online]. Available: <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Aspects-scientifiques/Compositions-des-vaccins/Vaccins-vivants-attenues>
- [74] ‘Vaccins inactivés ou inertes’. Accessed: Jan. 07, 2022. [Online]. Available: <https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Aspects-scientifiques/Compositions-des-vaccins/Vaccins-inactives>
- [75] ‘BOOSTRIXTETRA’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/boostrixtetra-26147.html>
- [76] ‘VACCIN RABIQUE PASTEUR’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/vaccin-rabique-pasteur-26361.html>
- [77] ‘RABIPUR’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/rabipur-23737.html>
- [78] ‘AVAXIM’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/avaxim-819.html>
- [79] ‘Les différents types de vaccins contre la COVID-19’. Accessed: Jan. 07, 2022. [Online]. Available: <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>

- [80] ‘TYPHIM VI’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/typhim-vi-25947.html>
- [81] ‘TYAVAX - VIDAL’. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/tyavax-23719.html>
- [82] ‘Immunogénicité des vaccins - Immunologie de la vaccination - Professionnels de la santé - MSSS’. Accessed: Jan. 07, 2022. [Online]. Available: <https://msss.gouv.qc.ca/professionnels/vaccination/piq-immunologie-de-la-vaccination/immunogenicite-des-vaccins/>
- [83] ‘REPEVAX - MesVaccins.net’. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: [https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/29-repevax#vaccin\\_composition](https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/29-repevax#vaccin_composition)
- [84] ‘TRUMENBA susp inj en seringue préremplie’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/trumenba-susp-inj-en-seringue-preremplie-182042.html>
- [85] ‘CERVARIX 20 µg/20 µg susp inj en seringue préremplie’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/cervarix-20-mcg-20-mcg-susp-inj-en-seringue-preremplie-82527.html>
- [86] CDC, ‘Understanding How Vaccines Work’, Centers for Disease Control and Prevention. Accessed: Aug. 18, 2022. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/conversations/understanding-vacc-work.html>
- [87] ‘ACT-HIB 10 µg/0,5 ml pdre/solv p sol inj seringue préremplie’, VIDAL. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/medicaments/act-hib-10-mcg-0-5-ml-pdre-solv-p-sol-inj-seringue-preremplie-218.html>
- [88] Janssen Vaccines & Prevention B.V., ‘A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 1/2a Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Ad26COVS1 in Adults Aged 18 to 55 Years Inclusive and Adults Aged 65 Years and Older’, clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT04436276, Aug. 2022. Accessed: Aug. 25, 2022. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04436276>
- [89] ‘Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès’, Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <http://www.mesvaccins.net/web/vaccines/666-jcovden-covid-19-vaccine-janssen>
- [90] AstraZeneca, ‘A Phase III Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Multicenter Study in Adults, to Determine the Safety, Efficacy, and Immunogenicity of AZD1222, a Non-replicating ChAdOx1 Vector Vaccine, for the Prevention of COVID-19’, clinicaltrials.gov, Clinical trial

- registration NCT04516746, Jul. 2022. Accessed: Aug. 25, 2022. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04516746>
- [91] ‘Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès’, Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <http://www.mesvaccins.net/web/vaccines/650-vaxzevria>
- [92] ‘Ervebo, le premier vaccin antiEbola bientôt autorisé en Europe’, VIDAL. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/actualites/23969-ervebo-le-premier-vaccin-anti-ebola-bientot-autorise-en-europe.html>
- [93] J.-D. Lelièvre, ‘Les vaccins de demain’, *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2019, no. 512, pp. 52–63, May 2019, doi: 10.1016/S1773-035X(19)30258-8.
- [94] A. J. da Silva, T. C. Zangirolami, M. T. M. Novo-Mansur, R. de C. Giordano, and E. A. L. Martins, ‘Live bacterial vaccine vectors: An overview’, *Braz. J. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1117–1129, Mar. 2015.
- [95] M. Pilaev, ‘Développement de vaccins sous-unitaires contre le métapneumovirus humain’, p. 105.
- [96] ‘Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès’, Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <http://www.mesvaccins.net/web/vaccines/678-medicago-vlp-covid>
- [97] S. Canada, ‘Vaccins contre la COVID-19 produits sur plantes : À propos, fonctionnement, innocuité’. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/covid19-industrie/medicaments-vaccins-traitements/vaccins/produits-sur-plantes.html>
- [98] S. Canada, ‘Vaccin Covifenz de Medicago contre la COVID-19’. Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/covid19-industrie/medicaments-vaccins-traitements/vaccins/medicago.html>
- [99] E. Anassi and U. A. Ndefo, ‘Sipuleucel-T (Provenge) Injection’, *Pharm. Ther.*, vol. 36, no. 4, pp. 197–202, Apr. 2011.
- [100] S. Jarosławski and M. Toumi, ‘Sipuleucel-T (Provenge®)-Autopsy of an Innovative Paradigm Change in Cancer Treatment: Why a Single-Product Biotech Company Failed to Capitalize on its Breakthrough Invention’, *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.*, vol. 29, no. 5, pp. 301–307, Oct. 2015, doi: 10.1007/s40259-015-0140-7.
- [101] S. I. M. Sutherland, X. Ju, L. G. Horvath, and G. J. Clark, ‘Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer’, *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 641307, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.641307.

- [102] EMA, ‘Provence’, European Medicines Agency. Accessed: Oct. 20, 2023. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/provence>
- [103] K. Maisnier-Patin, S. Crabé, G. Breton, F. P. Dupuy, B. Yassine-Diab, and R.-P. Sékaly, ‘Les cellules dendritiques transfectées avec de l’ARN messager - Une approche prometteuse en immunothérapie’, *médecine/sciences*, vol. 23, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2007, doi: 10.1051/medsci/2007233279.
- [104] L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman, ‘Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance’, *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 12, pp. 1627–1638, Dec. 2002, doi: 10.1084/jem.20021598.
- [105] B. Pitard, ‘Nanotaxi® pour les vaccins ARN et ADN’, *médecine/sciences*, vol. 35, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2019, doi: 10.1051/medsci/2019143.
- [106] S. Valpione, L. G. Campana, J. Pigozzo, and V. Chiarion-Sileni, ‘Consolidation electrochemotherapy with bleomycin in metastatic melanoma during treatment with dabrafenib’, *Radiol. Oncol.*, vol. 49, no. 1, pp. 71–74, Mar. 2015, doi: 10.2478/raon-2014-0035.
- [107] L. M. Mir *et al.*, ‘[Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]’, *C. R. Acad. Sci. III*, vol. 313, no. 13, pp. 613–618, 1991.
- [108] E. Dolgin, ‘The tangled history of mRNA vaccines’, *Nature*, vol. 597, no. 7876, pp. 318–324, Sep. 2021, doi: 10.1038/d41586-021-02483-w.
- [109] L. Versteeg, M. M. Almutairi, P. J. Hotez, and J. Pollet, ‘Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections’, *Vaccines*, vol. 7, no. 4, p. 122, Sep. 2019, doi: 10.3390/vaccines7040122.
- [110] M. Gozlan, ‘L’aventure scientifique des vaccins à ARN messager’, *LE Monde*, Dec. 14, 2020. [Online]. Available: <https://www.lemonde.fr/blog/realitesbiomedicales/2020/12/14/laventure-scientifique-des-vaccins-a-arn-messenger/>
- [111] G. T. Szabó, A. J. Mahiny, and I. Vlatkovic, ‘COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments’, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 30, no. 5, pp. 1850–1868, May 2022, doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.016.
- [112] S. L. Nutt, P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton, and L. M. Corcoran, ‘The generation of antibody-secreting plasma cells’, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 160–171, Mar. 2015, doi: 10.1038/nri3795.
- [113] M. Echaide, L. Chocarro de Erauso, A. Bocanegra, E. Blanco, G. Kochan, and D. Escors, ‘mRNA Vaccines against SARS-CoV-2: Advantages and Caveats’, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 6, p. 5944, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24065944.

- [114] D. Lu, R. Benjamin, M. Kim, R. M. Conry, and D. T. Curiel, 'Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors', *Cancer Gene Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 245–252, Dec. 1994.
- [115] K. K. L. Phua, K. W. Leong, and S. K. Nair, 'Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format', *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 166, no. 3, pp. 227–233, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029.
- [116] Y. Weng *et al.*, 'Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology', *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 19, pp. 581–601, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.omtn.2019.12.004.
- [117] Z. Zhong *et al.*, 'mRNA therapeutics deliver a hopeful message', *Nano Today*, vol. 23, pp. 16–39, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.nantod.2018.10.005.
- [118] L. A. Brito *et al.*, 'A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines', *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 12, pp. 2118–2129, Dec. 2014, doi: 10.1038/mt.2014.133.
- [119] T. Démoulines *et al.*, 'Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines', *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 711–722, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.nano.2015.11.001.
- [120] 'Maladie Covid-19 (nouveau coronavirus)', Institut Pasteur. Accessed: Nov. 22, 2022. [Online]. Available: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/maladie-covid-19-nouveau-coronavirus>
- [121] E. Tadini *et al.*, 'SARS-CoV-2, un point dans la tourmente', *Rev. Médicale Suisse*, vol. 16, no. 692, pp. 917–923, 2020, doi: 10.53738/REVMED.2020.16.692.0917.
- [122] P. E. Marik, J. Iglesias, J. Varon, and P. Kory, 'A scoping review of the pathophysiology of COVID-19', *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 35, p. 20587384211048026, Sep. 2021, doi: 10.1177/20587384211048026.
- [123] EMA, 'Comirnaty', European Medicines Agency. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>
- [124] EMA, 'Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna)', European Medicines Agency. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax>
- [125] EMA, 'Nuvaxovid', European Medicines Agency. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/nuvaxovid>
- [126] EMA, 'Jcovden (previously COVID-19 Vaccine Janssen)', European Medicines Agency. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/jcovden-previously-covid-19-vaccine-janssen>
- [127] 'Vaxzevria, COVID 19 Vaccine (ChAdOx1 S [recombinant])', p. 5.

- [128] F. C. M. Kirsebom, N. Andrews, R. Sachdeva, J. Stowe, M. Ramsay, and J. Lopez Bernal, ‘Effectiveness of ChAdOx1-S COVID-19 booster vaccination against the Omicron and Delta variants in England’, *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, p. 7688, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-35168-7.
- [129] ‘Vaccination par âge, type de vaccin et département de résidence — Data vaccin Covid’. Accessed: Aug. 31, 2022. [Online]. Available: <https://datavaccin-covid.ameli.fr/pages/type-vaccins/>
- [130] D. D. Kang, H. Li, and Y. Dong, ‘Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics’, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 199, p. 114961, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.addr.2023.114961.
- [131] S. S. Rosa, D. M. F. Prazeres, A. M. Azevedo, and M. P. C. Marques, ‘mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks’, *Vaccine*, vol. 39, no. 16, pp. 2190–2200, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.vaccine.2021.03.038.
- [132] T. Schlake, A. Thess, M. Fotin-Mleczek, and K.-J. Kallen, ‘Developing mRNA-vaccine technologies’, *RNA Biol.*, vol. 9, no. 11, pp. 1319–1330, Nov. 2012, doi: 10.4161/rna.22269.
- [133] ‘Le développement d’un vaccin en temps normal et dans le contexte d’une pandémie’. Accessed: Oct. 19, 2022. [Online]. Available: <https://www.leem.org/media/le-developpement-dun-vaccin-en-temps-normal-et-dans-le-contexte-dune-pandemie>
- [134] M. Li *et al.*, ‘COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects’, *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–32, May 2022, doi: 10.1038/s41392-022-00996-y.
- [135] ‘Premier vaccin contre la COVID19 disponible en France : COMIRNATY, en pratique’, VIDAL. Accessed: Jul. 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.vidal.fr/actualites/26442-premier-vaccin-contre-la-covid-19-disponible-en-france-comirnaty-en-pratique.html>
- [136] T. Killeen, V. Kermer, and R. Troxler Saxer, ‘mRNA vaccine development during the COVID-19 pandemic: a retrospective review from the perspective of the Swiss affiliate of a global biopharmaceutical company’, *J. Pharm. Policy Pract.*, vol. 16, p. 158, Nov. 2023, doi: 10.1186/s40545-023-00652-y.
- [137] ‘Q&A: Conditional Marketing Authorisation of COVID-19 Vaccine’, European Commission - European Commission. Accessed: May 23, 2024. [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda\\_20\\_2390](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda_20_2390)
- [138] ‘A new era for vaccine development?’, PHG Foundation. Accessed: Nov. 13, 2021. [Online]. Available: <https://www.phgfoundation.org/blog/a-new-era-for-vaccine-development>
- [139] S. Amanpour, ‘The Rapid Development and Early Success of Covid 19 Vaccines Have Raised Hopes for Accelerating the Cancer Treatment Mechanism’, *Arch. Razi Inst.*, vol. 76, no. 1, pp. 1–6, Mar. 2021, doi: 10.22092/ari.2021.353761.1612.

- [140] ‘Immunothérapie des cancers · Inserm, La science pour la santé’, Inserm. Accessed: Aug. 26, 2022. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/dossier/immunotherapie-cancers/>
- [141] C. Bosetti, F. Turati, and C. La Vecchia, ‘Hepatocellular carcinoma epidemiology’, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 28, no. 5, pp. 753–770, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.bpg.2014.08.007.
- [142] P. Dm, B. L, and W. Lc, ‘16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010’, *Br. J. Cancer*, vol. 105 Suppl 2, no. Suppl 2, Jun. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.489.
- [143] E.-K. Yim and J.-S. Park, ‘The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis’, *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.*, vol. 37, no. 6, pp. 319–324, Dec. 2005, doi: 10.4143/crt.2005.37.6.319.
- [144] L. Bialkowski *et al.*, ‘Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours’, *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 22509, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep22509.
- [145] A. Siri, H. de Boysson, and G. Boursier, ‘Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+’, *médecine/sciences*, vol. 28, no. 6–7, Art. no. 6–7, Jun. 2012, doi: 10.1051/medsci/2012286019.
- [146] Q. Yang *et al.*, ‘Analysis of Pre-existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol (PEG) in the General Population’, *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 23, pp. 11804–11812, Dec. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03437.







## **MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-

### **Les vaccins à ARN messager : l'évolution d'une technique**

Clara PAILLER-PRADEAU

#### Résumé :

Les premières utilisations de la vaccination remontent à plus de 11 siècles pour lutter contre les épidémies de variole. Depuis, les avancées scientifiques ont permis d'étendre l'utilisation de la vaccination à d'autres maladies, notamment grâce au développement de différents types de vaccins, tel que le BCG qui est un vaccin vivant atténué utilisé depuis environ un siècle, ou plus récemment les vaccins à ARN messager utilisés depuis 2021 pour lutter contre la COVID-19. Ces derniers sont l'aboutissement des recherches menées sur l'ARN messager depuis près de 60 ans, mais leur mise sur le marché a aussi été influencée par l'urgence sanitaire exceptionnelle causée par la pandémie de COVID-19. Ce travail a pour but de mettre en évidence les différentes étapes de la recherche sur l'ARN messager ayant permis son utilisation dans les vaccins, ainsi que les différences qui existent entre ce nouveau type de vaccins et ceux précédemment utilisés, notamment dans le cadre de la COVID-19.

#### Abstract :

Vaccination was first used over 11 centuries ago to prevent smallpox epidemics. Since then, scientific advances have made it possible to extend the use of vaccination to other diseases, in particular through the development of different types of vaccines, such as BCG, which is a live attenuated vaccine that has been in use for around 100 years, and more recently messenger RNA vaccines, which have been used since 2021 to prevent COVID-19. These new vaccines are the culmination of research conducted on messenger RNA for nearly 60 years, but their launch on the market was also influenced by the exceptional health emergency caused by the COVID-19 pandemic. The aim of this work is to highlight the various stages of research about messenger RNA that led to its use in vaccines, and the differences between this new type of vaccine and those previously used, particularly in the context of COVID-19.