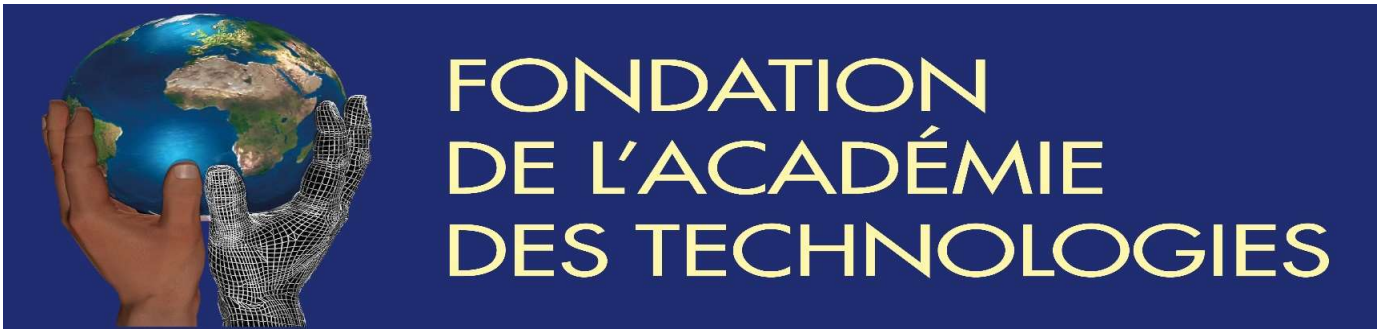

L'ARN MESSAGER, UN NOUVEAU PARADIGME THERAPEUTIQUE

Rédacteur Bruno JARRY, membre de l'Académie des Technologies

Table des matières

1. Introduction

2. Principes biologiques

3. Fabrication

4. Applications

5. Conclusion

Trimestriel numéro 14 juin 2022

1. Introduction

La découverte de l'ARN messager[1], intermédiaire entre le gène ADN, support de l'hérédité et la protéine codée par le gène, remonte au tout début des années 1960[2].

Mais la découverte de la biochimie de sa fabrication *in vivo* et *in vitro* et celle des mécanismes biologiques de son utilisation s'est étalée sur une trentaine d'années, entre les expériences de transcription *in vitro* du gène par l'enzyme ARN Polymérase jusqu'aux premiers essais pour tenter de produire, au sein des cellules cancéreuses, des protéines anticorps pour bloquer leur développement *in situ*.

La Figure 1 décrit ces principales étapes.

Plusieurs groupes de recherche américains avaient perçu très tôt l'intérêt potentiel de cette molécule comme médicament biologique.

Toutefois, sa grande instabilité chimique *in vivo* dans le cytoplasme de la cellule mais aussi *in vitro* dans les conditions du laboratoire ont empêché très longtemps le développement de l'ARNm comme médicament.

Plus récemment, deux approches ont permis de stabiliser des ARNm : l'incorporation de certains nucléosides non biologiques dans la molécule et la mise au point de l'encapsulation des molécules d'ARN messager dans des nanoparticules lipidiques non biologiques.

Ces méthodes ont ouvert la voie à des résultats fiables et reproductibles. Les résultats spectaculaires obtenus en 2020 dans le cas des vaccins à ARN messager sont donc les héritiers d'une très longue suite de résultats, mêlant science fondamentale et ingénierie génétique sophistiquée.

Cette note, après la description des principes biologiques maintenant bien connus de la synthèse *in vivo* de l'ARN messager dans la cellule, tentera de résumer les grandes étapes de la fabrication d'un ARN messager actif et des très nombreux composants entrant dans cette fabrication, maintenant industrialisée dans le cas des vaccins contre le SARS-COV-2.

Nous explorerons ensuite l'état de l'art et les développements en cours de l'utilisation des ARN messagers pour la production de nouveaux vaccins ainsi que de nouvelles applications rendues possibles par les avancées maintenant accessibles tant des outils biologiques disponibles que des garanties d'innocuité obtenues par l'observation des résultats des expériences en vraie grandeur qu'ont été l'utilisation des vaccins à ARN messagers dans le cadre de l'épidémie de COVID.

[1] L'ARN est une macromolécule d'acide ribonucléique à simple brin ; l'ADN, macromolécule d'acide désoxyribonucléique à double brin.

[2] François Gros, membre de l'Académie des technologies (†2022) est avec François Jacob et les équipes américaines avec lesquelles ils travaillaient à l'époque, un des codécouvreurs de l'ARN messager.

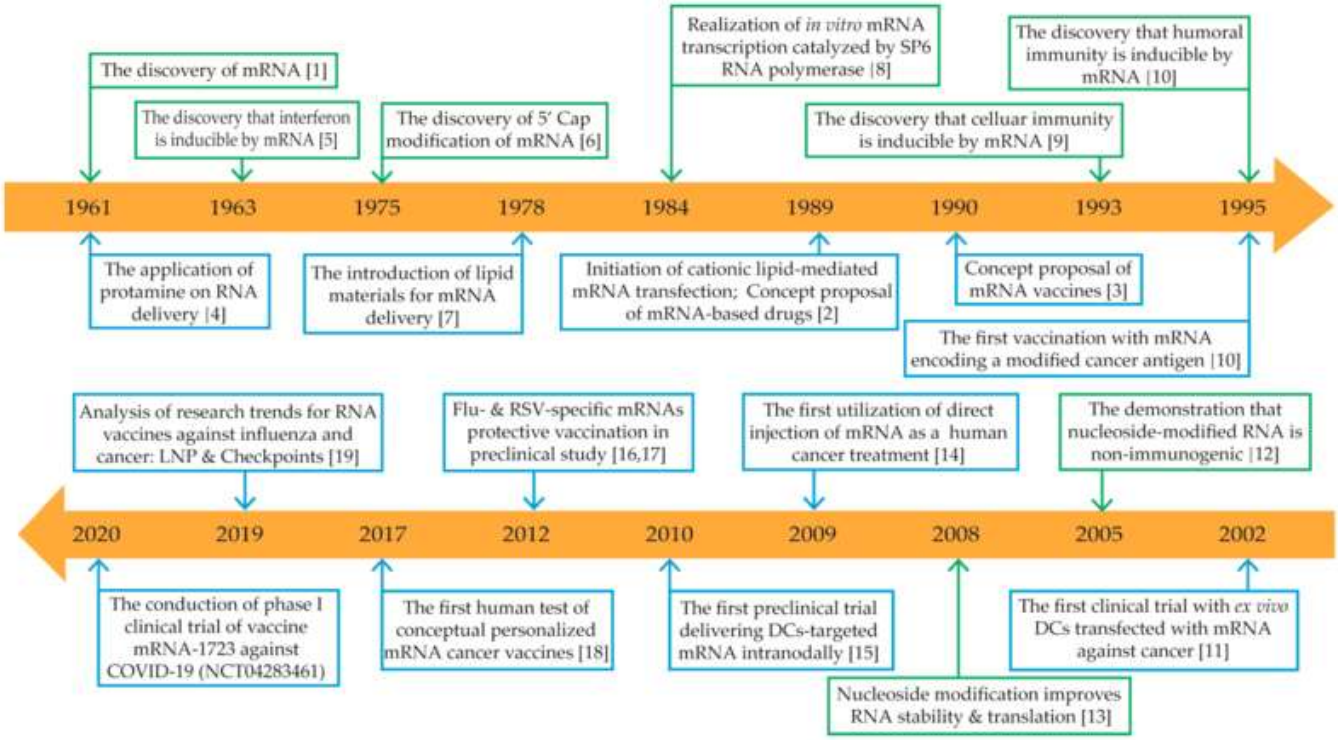

Figure 1 : Etapes clé dans le développement du concept d'utilisation de la technologie de l'ARN messager comme système de traitement des maladies. **(https://en.wikipedia.org/wiki/MRNA_vaccine)**

2. Principes biologiques[3]

Chimiquement, l'ARN est un polymère linéaire constitué d'un enchaînement de nucléotides. Chaque nucléotide contient un groupe phosphate, un sucre (le ribose) et une base azotée (ou base nucléique). Les nucléotides sont liés par des liaisons phosphodiesters. On trouve quatre bases nucléiques dans l'ARN : l'adénine, la guanine, la cytosine et l'uracile. (Figure 2).

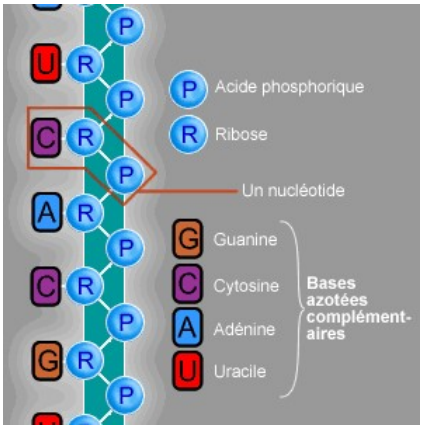

Figure 2 : Structure moléculaire de l'ARN

[3] Ce paragraphe est largement basé sur les articles de Wikipédia qui font un excellent point sur ces données aujourd'hui considérées comme classiques : le lecteur pourra s'y référer pour plus de détails et pour la bibliographie. https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique et https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique_messager

L'ARN a de nombreuses similitudes avec l'ADN, avec cependant quelques différences importantes : d'un point de vue structurel, l'ARN contient des résidus de ribose là où l'ADN contient du désoxyribose, ce qui rend l'ARN chimiquement moins stable ; de plus la thymine de l'ADN y est remplacée par l'uracile, qui possède les mêmes propriétés d'appariement de base avec l'adénine. Sur le plan fonctionnel, l'ARN se trouve le plus souvent dans les cellules sous forme monocaténaire, c'est-à-dire de simple brin, tandis que l'ADN est présent sous forme de deux brins complémentaires formant une double-hélice.

Enfin, les molécules d'ARN présentes dans les cellules sont plus courtes que l'ADN du génome, leur taille variant de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides, contre quelques millions à quelques milliards de nucléotides pour l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Dans la cellule, l'ARN est produit par transcription à partir de l'ADN (qui est situé dans le noyau chez les Eucaryotes). L'ARN est donc une copie d'une région de l'un des brins de l'ADN. Les enzymes qui effectuent la copie ADN → ARN s'appellent des ARN polymérases. Les ARN ainsi produits peuvent avoir trois grands types de fonctions : ils peuvent être supports de l'information génétique d'un ou plusieurs gènes codant des protéines (on parle alors d'ARN messagers ou ARNm), ils peuvent adopter une structure secondaire et tertiaire stable et accomplir des fonctions catalytiques (par exemple l'ARN ribosomique), ils peuvent enfin servir de guide ou de matrice pour des fonctions catalytiques accomplies par des facteurs protéiques (ce qui est par exemple le cas des microARN).

2.1 ARN messager

L'information génétique d'une cellule qui gouverne l'essentiel des aspects de son fonctionnement est contenue dans son génome lui-même constitué d'ADN. Cette information doit être traduite sous la forme de protéines, qui sont les molécules effectrices de l'organisme vivant.

Plutôt que d'utiliser directement la matrice d'ADN pour synthétiser des protéines, l'évolution a établi une molécule intermédiaire, l'ARN messager.

Cet ARNm est une copie transitoire de la partie de l'ADN contenant les instructions d'assemblage d'une protéine, c'est-à-dire son gène. En effet, à un gène donné correspond en général une protéine.

La présence des ARNm en tant que molécules intermédiaires permet aussi de réguler l'expression des gènes.

Les besoins cellulaires pour une protéine donnée peuvent varier en fonction des conditions environnementales, du type cellulaire, du stade de développement, de l'âge de la cellule.

Les ARNm sont des molécules labiles, dont la durée de vie est limitée, variant de quelques minutes à quelques heures au sein de la cellule où elles ont été synthétisées.

Leur production peut être adaptée par la cellule aux conditions spécifiques auxquelles la cellule est confrontée.

Lorsqu'une protéine est nécessaire, la cellule transcrit l'ARNm correspondant. Lorsqu'à l'inverse elle n'en a plus besoin, la transcription du gène s'arrête et l'ARNm est progressivement dégradé par des enzymes appelées ribonucléases (ou RNases).

Ainsi la production de protéine peut être stimulée ou réprimée en fonction des besoins.

La régulation de la production d'une protéine à partir de son gène peut s'effectuer à plusieurs niveaux : par la régulation de la transcription de l'ADN en ARNm que l'on appelle le contrôle transcriptionnel, ou par le

contrôle de la traduction de l'ARNm en protéine, que l'on appelle le contrôle traductionnel ou régulation de la traduction.

La cellule peut donc « choisir » quelles parties de l'ADN seront transcrites et ainsi exprimées.

Si certaines parties de l'ADN présent dans la cellule sont exprimées constamment, les différentes cellules d'un organe expriment différentes parties du génome pour obtenir un phénotype différent selon la présence de facteurs de régulation.

On distingue trois principales régions fonctionnelles dans un ARNm : la région 5' non traduite (5'-UTR), le ou les cistrons codants et enfin la région 3' non traduite (3'-UTR). Les deux régions non traduites ou régions UTR (de l'anglais *untranslated regions*) contiennent souvent des signaux d'expression ou de maturation de l'ARN. (Figure 3)

Figure 3 : Structure d'un ARN messager eucaryote mature

Ce caractère simple brin de l'ARNm n'empêche pas des repliements locaux complexes et parfois très structurés de la molécule sur elle-même faisant intervenir la complémentarité entre bases nucléiques.

On distingue deux niveaux d'organisation structurale de la molécule d'ARN : la structure secondaire, qui est définie par les appariements dits Watson-Crick entre bases, et la structure tertiaire, qui est une étape supplémentaire de repliement en trois dimensions de la molécule.

Dans le cas des ARNm, les structures secondaires peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, en modulant l'efficacité d'une ou plusieurs des étapes de transcription et de traduction.

Par exemple, la présence de structures secondaires de la région 5' non traduite peut influencer le recrutement du ribosome et donc l'efficacité de la traduction.

Les structures secondaires peuvent également être des sites de liaisons pour des protéines qui modulent l'épissage ou la polyadénylation.

2.2 Synthèse de l'ARNm *in vivo*

La synthèse d'une molécule d'ARN à partir de l'ADN s'appelle la transcription.

C'est un processus complexe qui fait intervenir une enzyme de la famille des ARN polymérases ainsi que des protéines associées. Les différentes étapes[4] de cette synthèse sont l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Après la transcription proprement dite, l'ARN peut subir une série de modifications post-transcriptionnelles dans le cadre d'un processus de maturation au cours duquel sa séquence et sa structure chimique peuvent être modifiées (voir plus loin)

[4] Les organismes procaryotes (bactéries sans noyau) ou eucaryotes (organismes avec noyau) varient dans le détail des mécanismes de synthèse des ARNm. Nous ne traitons ici que les cas des eucaryotes.

Initiation

Le démarrage de la transcription d'un ARN par une ARN polymérase s'effectue au niveau d'une séquence spécifique sur l'ADN, appelée promoteur.

Ce promoteur comporte un ou plusieurs éléments de séquence conservés sur lesquels se fixent en général des protéines spécifiques, les facteurs de transcription.

Juste en amont du site d'amorçage de la transcription, l'élément proximal est en général riche en nucléotides T et A, et est pour cette raison appelé boîte TATA chez les eucaryotes.

Les facteurs de transcription favorisent le recrutement de l'ARN polymérase sur le promoteur et l'ouverture du duplex d'ADN.

Il se forme alors ce qu'on appelle une bulle de transcription avec l'ADN ouvert, dont l'un des brins (la matrice) est hybridé avec l'ARN en cours de synthèse.

Élongation

Une fois l'ARN polymérase fixée sur le promoteur et la bulle de transcription formée, elle synthétise les premiers nucléotides de manière statique sans quitter la séquence du promoteur.

Les facteurs de transcription se détachent et l'ARN polymérase devient processive.

Elle transcrit alors l'ARN dans le sens 5' vers 3', en utilisant l'un des deux brins de l'ADN comme matrice et des ribonucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP et UTP) comme précurseurs.

Terminaison

Chez les eucaryotes, la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase II est couplée à la polyadénylation.

Deux complexes protéiques, CPSF (en) et CStF (en) reconnaissent les signaux de polyadénylation (5’-AAUAAA-3’) et de coupure de l'ARN.

Ils clivent l'ARN, induisent le détachement de la polymérase de l'ADN et recrutent la poly-A polymérase qui ajoute la queue poly(A)**.**

Maturation

La maturation des ARN comprend un ensemble de modifications post-transcriptionnelles qui jouent un rôle important dans le devenir de l'ARN maturé.

Les principales modifications sont l'adjonction d'une coiffe en 5’, la polyadénylation en 3’, l'épissage, l'introduction de modifications chimiques au niveau de la base ou du ribose et enfin l'édition.

Coiffe

La coiffe, ou 5’-cap en anglais, est un nucléotide modifié qui est ajouté à l'extrémité 5' de l'ARN messager dans les cellules d'eucaryotes.

Elle se compose d'un résidu de guanosine méthylé lié par une liaison 5’-5’ triphosphate au premier nucléotide transcrit par l'ARN polymérase.

Cette modification est introduite dans le noyau de la cellule, par l'action successive de plusieurs enzymes : polynucléotide 5'-phosphatase, ARN guanylyltransférase, méthyltransférases.

La coiffe joue plusieurs rôles : elle accroît la stabilité de l'ARN en le protégeant de la dégradation par des exonucléases 5'-3' et permet également le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction nécessaires à la fixation du ribosome sur les ARN messagers cellulaires.

La coiffe est donc essentielle à la traduction de la plupart des ARNm.

Polyadénylation

La polyadénylation consiste en l'addition d'une extension à l'extrémité 3' de l'ARN composée exclusivement de ribonucléotides de type adénosine (A). Pour cette raison, l'extension est appelée queue poly(A).

Bien que composée de nucléotides standard, cette queue poly(A) est ajoutée de façon post-transcriptionnelle par une enzyme spécifique appelée poly(A) polymérase et n'est pas codée dans l'ADN génomique.

La queue poly(A) est trouvée principalement à l'extrémité des ARN messagers. Chez les eucaryotes, la polyadénylation des ARNm est nécessaire à leur traduction par le ribosome et participe à leur stabilisation.

La queue poly(A) est en particulier reconnue par la PABP (poly(A)-binding protein, « protéine de liaison de la poly(A) »).

Épissage

L'épissage est une modification post-transcriptionnelle qui consiste en l'élimination des introns et la suture des exons dans les ARN messagers et dans certains ARN structurés comme les ARNt2.

Présents chez les organismes eucaryotes, les introns sont des segments d'ARN qui sont codés dans le génome et transcrits dans l'ARN précurseur, mais qui sont éliminés du produit final.

Dans la plupart des cas, ce processus fait intervenir une machinerie spécifique complexe appelée le spliceosome.

L'épissage se produit dans le noyau des cellules eucaryotes, avant l'export de l'ARN maturé vers le cytoplasme.

Édition

L'édition des ARN consiste en une modification de la séquence de l'acide ribonucléique, postérieure à la transcription par l'ARN polymérase.

À l'issue du processus d'édition, la séquence de l'ARN est donc différente de celle de l'ADN.

Les changements opérés peuvent être la modification d'une base, la substitution d'une base ou encore l'ajout d'une ou plusieurs bases.

Ces modifications sont effectuées par des enzymes qui agissent sur l'ARN, comme les cytidine désaminases, qui transforment chimiquement les résidus de cytidine en uridine.

3. Synthèse de l'ARNm in vitro[5]

On assiste depuis une trentaine d'années à un changement de paradigme dans le développement des médicaments, passant du screening de petites molécules chimiques au lancement de produits

[5] De nombreuses revues font le point sur les différents aspects de cette problématique. Nous nous sommes basés sur Tissue Eng Part A. 2019 Jan ;25(1-2) :91-112 et Mol Ther. 2019 Apr 10 ; 27(4) : 710–728. Nous y renvoyons le lecteur pour plus de détails.

“biopharmaceutiques », à base de peptides, protéines ou acides nucléiques. Parmi tous ces candidats, les acides nucléiques ont particulièrement concentré l’attention au vu de leur potentiel pour la thérapie génique et la médecine régénérative.

Le concept initial de la thérapie génique repose sur la possibilité d’introduire dans la cellule cible du matériel génétique capable de remplacer un gène défectueux : une fois introduit, ce matériel génétique produira la protéine manquante ou défectueuse *in vivo*, en utilisant les processus cellulaires de traduction déjà présents dans la cellule**.**

Si la technique de l’ADN plasmidique (pADN) recombinant a d’abord été utilisée avec succès pour cloner le gène d’une protéine spécifique dans des cellules bactériennes ou eucaryotes, elle s’est heurtée à plusieurs obstacles quand il s’est agi d’introduire le gène de façon transitoire dans les organes cibles.

En effet, l’ADN plasmidique pénètre très difficilement dans le cytoplasme des cellules. Il doit ensuite franchir la barrière de la membrane entourant le noyau, une étape également non physiologique.

Plusieurs approches ont été tentées pour lever ces barrières.

La première consiste à utiliser des vecteurs basés sur des virus comme systèmes d’introduction du matériel génétique : ces systèmes fonctionnent généralement bien pour la production de la protéine dont le gène a été introduit dans le vecteur viral mais leur cytotoxicité et leur immunogénicité limitent leur emploi pour les applications cliniques.

Une seconde approche a été l’utilisation de vecteurs non-viraux encapsulés dans des lipides et des polymères biocompatibles.

Malheureusement, l’expression du gène de la protéine recherchée est alors très inférieure à celle des systèmes viraux.

C’est la raison pour laquelle les chercheurs se sont finalement tournés vers l’utilisation directe de l’ARN messager.

L’ARNm présente plusieurs avantages sur l’approche via l’ADN plasmidique, avantages reflétant les différences fondamentales entre le métabolisme des molécules d’ARNm comparé à celui du gène porté par la molécule d’ADN.

L’utilisation de l’ARNm permet de sauter plusieurs étapes, le gène devant d’abord pénétrer dans le noyau, puis y être copié sous forme d’ARNm, lui-même étant traduit dans le cytoplasme de la cellule.

Sur le papier, l’introduction directe de l’ARNm doit permettre la production abondante et très rapide de la protéine, comparable à celle observée dans le cas des vecteurs viraux.

Qui plus est, cette production peut être éventuellement contrôlée en fonction de l’effet pharmacologique recherché à condition de maitriser les signaux correspondants au cours de la fabrication des molécules d’ARNm.

Toutefois, si la transcription *in vitro* de l’ARNm à partir d’une matrice ADN est relativement simple, rapide et aisément contrôlable, l’optimisation du procédé a été difficile et reste encore à perfectionner selon les applications recherchées. Nous en décrirons brièvement trois étapes clé :

- La synthèse in vitro proprement dite.
- L’introduction dans le polymère ARN de nucléotides chimiquement modifiés qui permettent d’augmenter la stabilité de l’ARNm dans le cytoplasme cellulaire et par conséquent sa durée de vie in situ, tout en maintenant sa capacité à être traduit en protéine.

- L'encapsulation des molécules d'ARNm dans des nanoparticules lipidiques qui améliorent considérablement l'efficacité du passage à travers la membrane cellulaire, augmentant de fait la concentration de l'ARNm dans le cytoplasme et donc sa disponibilité pour être traduit en protéine.

Synthèse *in vitro*

La transcription d'ARN *in vitro* à partir d'une matrice ADN est connue depuis les années 1990.

La façon la plus simple consiste à introduire dans un vecteur plasmidique (pADN) le gène pour lequel on cherche à synthétiser l'ARNm, associé à la séquence permettant la reconnaissance par l'enzyme RNA polymérase.

Les méthodes pour introduire dans un vecteur ADN une séquence codante particulière sont aujourd'hui automatisées et peuvent être réalisées, soit par des techniques entièrement chimiques, soit par des techniques faisant appel à des outils biologiques[6].

La construction d'un gène artificiel, c'est-à-dire n'existant pas dans la nature, mais pourvu de séquences connues pour apporter telle ou telle fonctionnalité connue et répertoriée dans les banques de données, ne pose par conséquent plus de problème.

Une fois construit, ce pADN peut ensuite être produit en grande quantité en l'introduisant dans une bactérie qui est ensuite cultivée en fermenteur. Le pADN est facilement extrait des bactéries. Il est purifié et utilisé directement après solubilisation dans une solution tampon, ou stocké sous alcool à -20°C.

La synthèse de l'ARNm, copie du gène cloné introduit dans le vecteur pADN fait intervenir tout un ensemble de réactions enzymatiques successives : (i) l'ouverture du vecteur plasmidique ; (ii) la synthèse de l'ARNm en utilisant l'enzyme RNA polymérase et un mélange de ribonucléotides-tri-phosphates ; (iii) la destruction du vecteur par l'action d'une DNase; (iv) l'addition de la queue PolyA et de la coiffe sur les molécules d'ARNm qui est réalisée en introduisant dans le milieu les enzymes correspondants[7].

Au fil des expériences, d'autres améliorations ont été testées, basées sur le corpus de connaissances accumulées sur l'expression de différents gènes.

Il est par exemple possible d'introduire, au niveau du gène cloné dans le pADN, une séquence UTR particulière connue pour son effet stabilisateur de l'ARNm qui en est copié, comme c'est le cas pour le messager de la protéine α-β globine humaine.

L'introduction de ces signaux est importante car elle permet une meilleure traduction de la molécule d'ARNm en permettant le recrutement des facteurs protéiques d'initiation de la traduction dans la cellule mais aussi en protégeant les molécules d'ARNm de la dégradation par les exonucléases présentes dans la cellule.

Ils diminuent aussi la réponse immunitaire une fois l'ARNm introduit dans les cellules.

La longueur de la queue PolyA est également un facteur important, chaque type cellulaire étant optimisé pour une taille donnée. Si ces améliorations sont publiées dans un cas précis, elles doivent être confirmées pour l'optimisation finale de chaque construction.

[6] Une description en est donnée dans le rapport de l'académie « https://www.academie-l'technologies.fr/publications/archiver-les-megadonnees-au-dela-de-2040-la-piste-de-ladn/ »

[7] Le détail des enzymes utilisées dans chacune de ces étapes sort du cadre nécessairement limité de cette note. Qu'il soit simplement indiqué à ce stade que ces enzymes et les cofacteurs nécessaires à leur activité sont aujourd'hui commercialisées.

L'ARNm est ensuite soumis à une étape de purification qui peut varier selon qu'il s'agit d'une expérience à l'échelle du laboratoire ou d'une production industrielle : une simple précipitation de l'ARN par addition de chlorure de lithium sera suffisante dans le premier cas.

Pour la préparation d'un ARNm utilisable comme médicament ou comme vaccin des purifications plus importantes, dans des conditions parfaitement définies et autorisées par la réglementation s'avéreront nécessaire.

La chromatographie d'affinité, qui permet de récupérer en jouant sur l'appariement des bases présentes dans la molécule d'ARNm est là une étape de choix. Enfin, la filtration tangentielle de flux permet une purification finale (Figure 3).

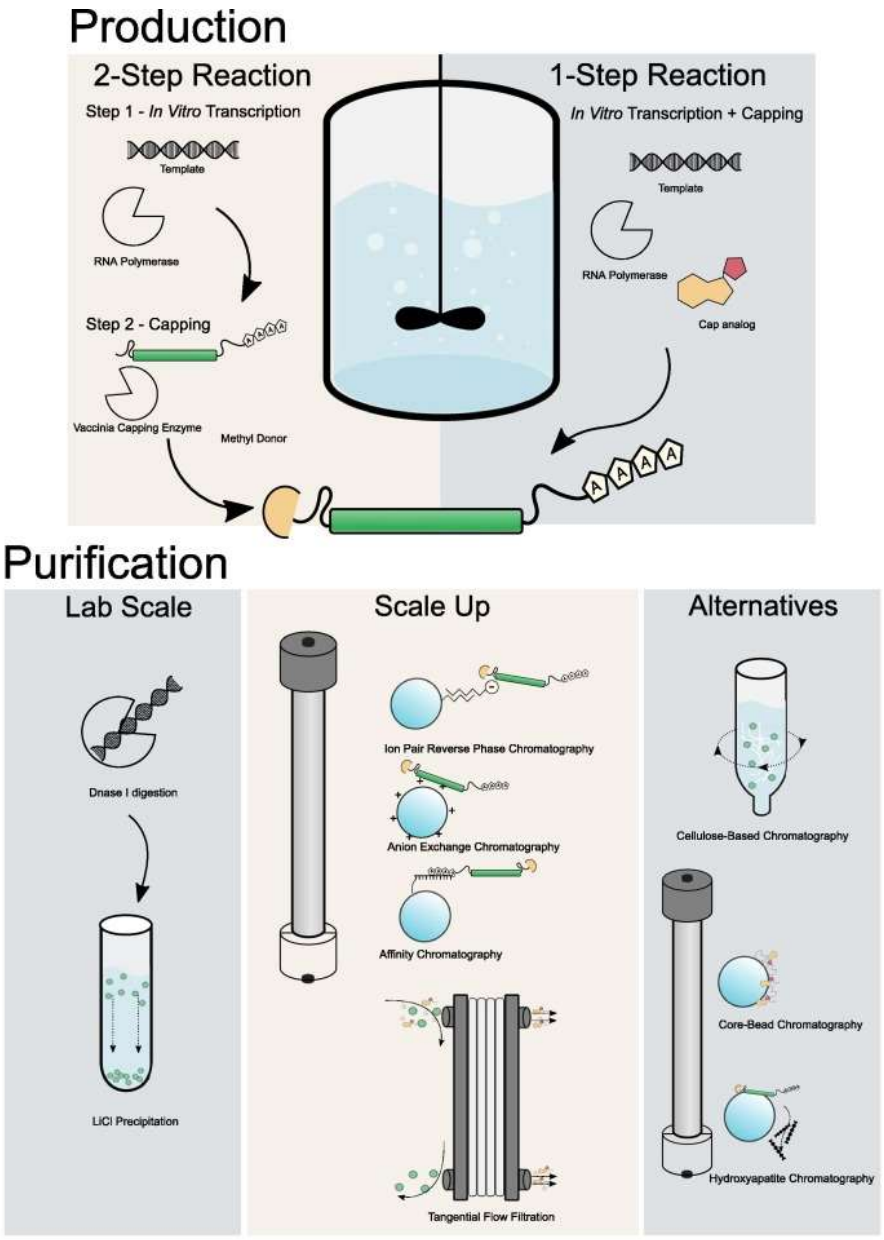

Figure 3 : Représentation schématique des étapes de production et de purification de l'ARN messager utilisable comme vaccin[8]

[8] D'après Rosa et al. Vaccine. 2021 Apr 15; 39(16): 2190–2200. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.03.038.

Nucléotides modifiés

Comme déjà mentionné plus haut, le système immunitaire des mammifères est bien adapté pour la reconnaissance et l'élimination des ARN exogènes.

Les macrophages et les cellules dendritiques reconnaissent en effet ces ARN induisant une cascade immunitaire qui conduit à leur destruction. Il a été trouvé que la présence dans la séquence de l'ARN exogène de bases modifiées permet de limiter, et même, au fur et à mesure des résultats publiés, d'éviter cet inconvénient.

Plusieurs modifications chimiques des bases ribonucléotidiques ont donc été testées avec succès, par exemple le remplacement de la base uridine par les bases non biologiques 5-methyluracile, 5-methylcytosine ou 5-methoxyuracile.

L'incorporation des ces bases modifiées, si elles augmentent souvent de beaucoup la durée de vie et la stabilité de l'ARNm *in vivo*, ne posent pas de problème pour sa synthèse *in vitro*, l'enzyme RNA polymérase n'étant pas inhibé par ces substrats non biologiques.

A titre d'exemple, les substitutions de bases apportées dans la synthèse de l'ARNm de la protéine *spike* du virus SARS-Cov-2, matière active des vaccins à ARN messager homologués en 2020 sont différentes dans les procédés des deux fabricants Pfizer et Moderna.

Plus généralement il apparait que l'efficacité des modifications de bases semble dépendre largement des méthodes et du type de modifications apportées ainsi que du type cellulaire et de l'état de différentiation des cellules cibles.

Il faut donc trouver les modifications de bases optimales selon l'application recherchée de l'utilisation de l'ARNm.

Transférer l'ARNm dans la cellule

Si la construction de la séquence de l'ARNm permet d'améliorer considérablement l'efficacité finale du système, le transfert de cet ARNm dans le cytoplasme des cellules *in vivo* demeure le point faible de l'ensemble, du fait du haut poids moléculaire des molécules mais aussi de leur charge électrique globalement négative.

Si les molécules d'ARNm ne sont pas introduites au bon endroit dans la cellule pour être rapidement traduites, elles seront rapidement dégradées dans l'environnement intracellulaire ou l'environnement cellulaire tous les deux bourrés de nucléases et par conséquent inactivées.

Plusieurs approches, toujours en cours de perfection, ont été tentées *in vitro* et *in vivo* à partir des travaux déjà cités plus haut réalisés pour l'introduction des ADNp dans les cellules. Adaptées aux molécules d'ARNm elles peuvent être classées en méthodes « physiques » et méthodes « chimiques ».

Les méthodes « physiques » :

Elles peuvent aujourd'hui être considérées essentiellement comme historiques. Directement dérivées des travaux réalisés pour transférer les molécules d'ADN dans les cellules, elles restent très difficiles à utiliser chez l'animal entier et *a fortiori* chez l'homme.

La plus utilisée, l'électroporation, fonctionne en appliquant un champ électrique pulsé aux cellules, qui conduit à « l'ouverture » les pores de la membrane cellulaire, créant de ce fait une entrée aux molécules de RNA messager.

Une autre approche est la micro injection de la solution contenant l'ARNm directement dans les cellules. Bien que très difficiles à réaliser, ces approches ont donné de bons résultats dans le cas de l'immunothérapie des cancers, dans la reprogrammation cellulaire et l'édition de gènes.

Elles transfèrent l'ARNm directement dans le cytoplasme des cellules, évitant ainsi et la dégradation dans l'endosome et l'activation du système immunitaire.

Elles restent toutefois onéreuses, invasives (nécessitant par exemple l'extraction du sang et la purification des types cellulaires recherchés) et nécessitent un grand savoir-faire technique.

Les méthodes « chimiques » : ce sont les méthodes actuellement utilisées.

Elles sont basées sur l'inclusion des molécules d'ARNm dans des nanoparticules structurées à partir de molécules cationiques, comme les polycations ou les lipides cationiques ou ionisés.

Les charges négatives des phosphates présents dans la chaine macromoléculaire permettent l'empaquetage des ARNm dans des nanoparticules.

La taille de la nanoparticule peut être ajustée à la longueur de la molécule de ARNm.

L'addition de matériaux inertes aux nanoparticules comme le polyéthylène glycol (PEG) facilite en plus l'inhibition de la reconnaissance immunitaire.

Le complexe moléculaire formé par la nanoparticule et la molécule d'ARNm est transféré dans la cellule s'effectue par endocytose, les nanoparticules chargées étant d'abord fixées à la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou hydrophobes puis internalisées.

L'emploi de ligands comme la transferrine ou l'acide folique permet d'augmenter encore la spécificité du mécanisme et son efficacité.

Un point essentiel dans le choix des types de nanoparticules est leur capacité à éviter la dégradation au niveau de l'endosome.

L'addition d'agents spécifiques s'est révélée très utile pour en limiter l'effet.

La grande flexibilité dans la structure des nanoparticules en fonction de la taille des molécules d'ARNm, leur coût abordable, leur faible toxicité et leur faible immunogénicité ont fait de ces méthodes chimiques le choix préféré des chercheurs pour l'introduction des ARNm dans les cellules, que ce soit *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*.

Là aussi une grande variété de solutions (voir Figure 4) a été proposée et testée. Le choix final dépend de la toxicité relative des différentes solutions proposées, de l'économie du système proposé et des possibilités de fabrication à l'échelle industrielle si une application médicamenteuse ou vaccinale est envisagée. Très récemment une formulation orale fonctionnelle a été testée sur des porcs avec de bons résultats.[9]

[9] Abramson A, Kirtane AR, Shi Y, et al. Oral mRNA delivery using capsule-mediated gastrointestinal tissue injections. Matter. 2022

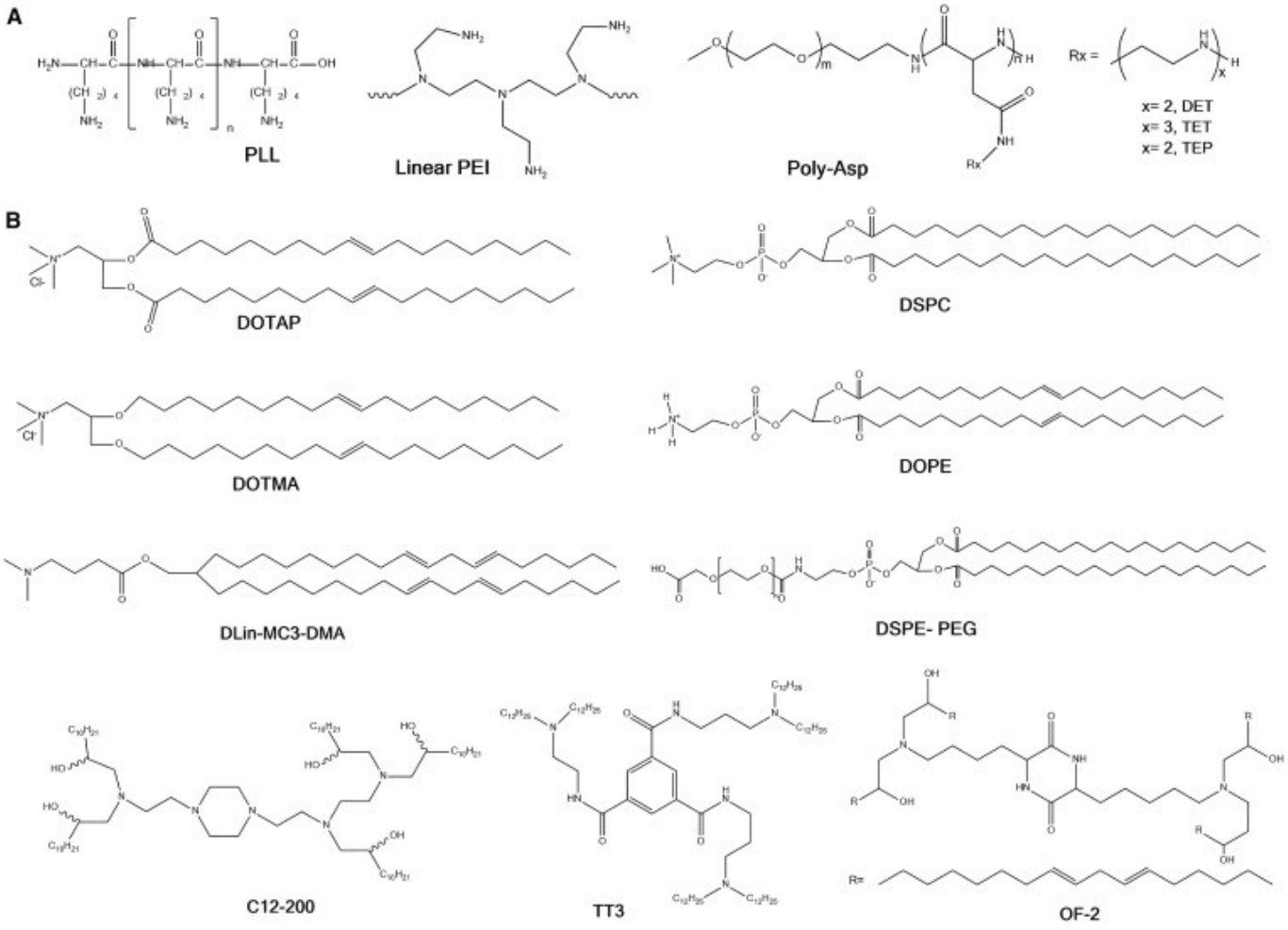

Figure 4 : *quelques structures en (A) de polycations et en (B) de lipides et analogues utilisés pour l'encapsulation d'ARNm dans des nanoparticules*[10]

4. Applications thérapeutiques

La technologie basée sur l'utilisation de l'ARN messager a trouvé rapidement beaucoup d'applications actuellement soit en développement, ou même déjà approuvées par les autorités sanitaires et déjà sur le marché. Nous en donnerons ici quelques exemples, classés par type d'application.

4.1 Maladies infectieuses / cancers

Le principe même de la vaccination basée sur l'ARN messager repose sur la production, à partir de la molécule d'ARNm introduite dans la cellule, d'une ou plusieurs protéines, les antigènes, qui vont stimuler une réponse immunitaire dirigée contre l'agent infectieux ou la cellule cancéreuse.

Les vaccins conventionnels préparés contre des agents infectieux entiers mais atténués ont pendant longtemps été la seule façon de dresser cette réponse immunitaire.

[10] D'après : Tissue Eng Part A. 2019 Jan 1; 25(1-2): 91–112

Le succès des deux vaccins basés sur l'ARNm de la protéine *spike* du corona virus a démontré la rapidité avec laquelle ce type de vaccins peuvent aujourd'hui être fabriqués et testés, sans danger ni pour le fabricant, ni pour le patient.

Comment fonctionnent ces vaccins ?

La réponse immunitaire : Antigène/anticorps

Quand une cellule est infectée par un agent pathogène comme un virus, le fonctionnement de la machinerie cellulaire est en partie détourné par le matériel génétique du virus pour fabriquer ses propres protéines aux dépens des protéines de la cellule.

Certaines de ces protéines appelées antigènes vont aller se coller à la surface de la cellule infectée et agissent comme des signaux de reconnaissance pour le système immunitaire. Les cellules du système immunitaire vont alors entrer en action contre l'intrus, en fabriquant des anticorps pour bloquer la production du virus.

La mise en route de cette réponse immunitaire dirigée contre un nouveau virus prend un certain temps : les patients infectés par exemple par le SARS-Cov-2 ne commencent à produire des anticorps contre le virus qu'au cours de la seconde semaine après l'apparition des symptômes.

La vaccination préventive

La vaccination préventive consiste à administrer à un individu en bonne santé l'ARN messager codant pour un ou plusieurs des antigènes du virus, la protéine *spike* dans le cas des vaccins Moderna et BioNTech. L'objectif est de déclencher la réaction immunitaire **avant** l'infection.

Celle-ci persistera un certain temps dans l'organisme, et bloquera très tôt une éventuelle contamination ultérieure.

La vaccination permet le développement de cellules immunitaires "mémoires", capables de reconnaître immédiatement l'agent pathogène s'il vient à infecter l'individu par la suite.

Tout de suite après la vaccination, les antigènes du virus fabriqués à partir de l'ARN messager sont captés par des cellules du système immunitaire, directement sur le site d'injection.

Ces cellules migrent ensuite vers le ganglion lymphatique le plus proche pour présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4. Dans les heures qui suivent, ces derniers activent les lymphocytes T CD8 "tueurs " et les lymphocytes B qui produisent les anticorps.

Cet enchainement permet d'éliminer les antigènes du virus en 3 à 5 jours. En outre, quelques lymphocytes T et B mémoires et des anticorps spécifiques persistent plusieurs mois et même années dans l'organisme : ils vont le protéger contre une éventuelle future infection impliquant le même virus.

Vaccins dirigés contre certains types de cancer[11]

[11] De bonnes revues sur ces développements ont été publiées recemment. Voir Miao et al. Molecular cancer (2021) 20 :41. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5. ou
Jian Liu et al.
Journal of Hematology & Oncology volume 15, Article number: 28 (2022)
https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01247-x

Sur le même principe que celui utilisé dans le cas des vaccins contre le SARS-Cov-2, il s'agit de produire dans l'environnement de la tumeur des protéines capables d'induire une réponse immunitaire ou de renforcer celles déjà actives.

On sait que les cellules cancéreuses fabriquent des protéines qui ne sont pas produites dans les cellules non cancéreuses du même tissu de l'organe. Les premiers essais avaient donc consisté à utiliser comme antigènes les cellules tumorales elles-mêmes.

Malheureusement ces antigènes se sont révélés peu immunogènes. Les chercheurs ont donc continué en purifiant individuellement ces protéines tumorales reconnues comme « étrangères » par les cellules T du système immunitaire.

La suite logique a été d'utiliser l'abord le DNA codant pour ces antigènes et maintenant, avec la technologie de l'ARN messager, la copie ARNm du gène encapsidé.

En pratique cela consiste (i) à mettre en culture les cellules de la biopsie tumorale, (ii) d'isoler une ou plusieurs de ces protéines marqueurs de la tumeur individuelle de chaque patient - on parle de néo antigènes – (iii) à partir de leurs séquences recodées sous forme des ARN messagers correspondants, préparer le vaccin « personnalisé ».

Certaines études font mention de plusieurs néo-antigènes différents, dont les séquences ont été optimisées en utilisant un algorithme pour se fixer au mieux sur les cellules T. Introduit dans l'organisme, ce vaccin à ARNm entrera dans les cellules, y fabriquera les néo-antigènes qui se fixeront sur les cellules T du patient, engendrant chez lui la réponse immunitaire recherchée.

Celle-ci, espère-t-on, détruira les cellules cancéreuses de la tumeur.

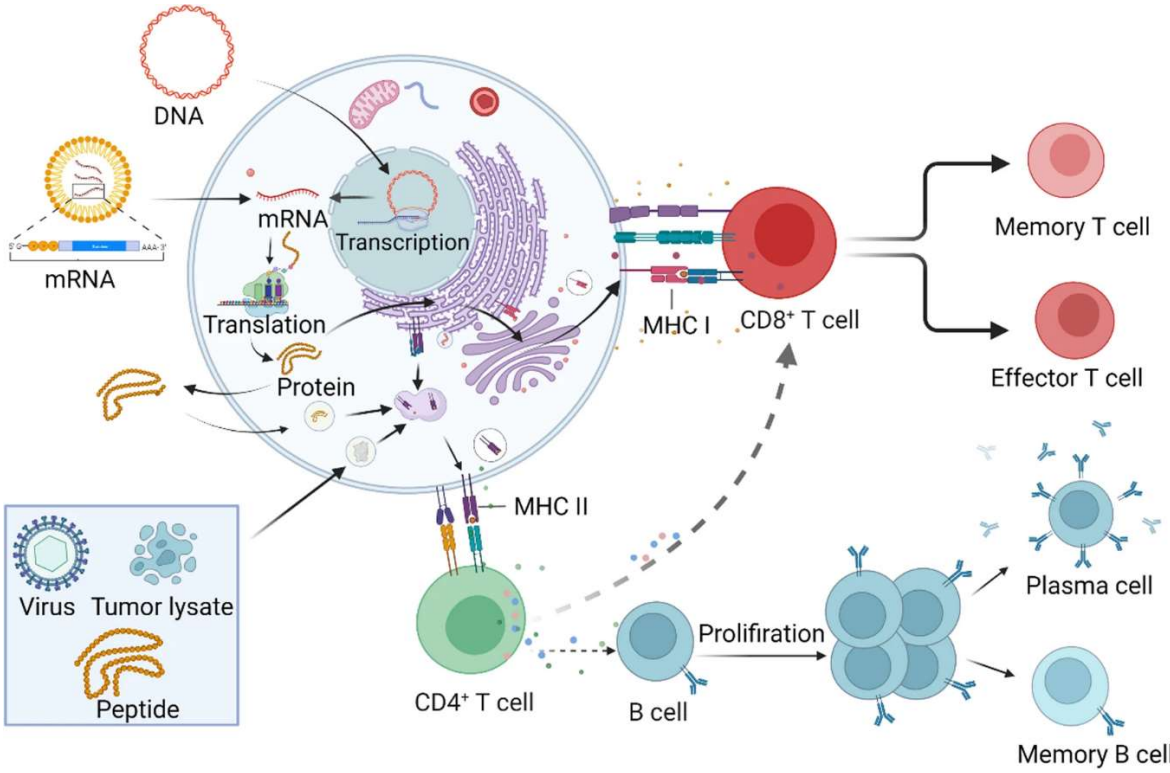

Figure 5 *: La cascade immunitaire impliquée dans les vaccins contre les cancers (d'après J. Liu et al. Ref. 12)*

De nombreux travaux sont actuellement en cours pour préciser quelles sont, pour chaque type de cancer étudié, les étapes les plus importantes de la cascade immunitaire à renforcer.

Par exemple, une variante consiste à rajouter dans le même vaccin, les ARNm de protéines adjuvantes de la réponse immunitaire, comme les interférons.

La grande flexibilité de la technologie ouvre la porte, on l'aura compris, à un champ considérable de possibilités d'action. Les études en cours devraient permettre de choisir les plus efficaces.

La Figure 6 montre le nombre de candidats vaccins classés par types de pathologies pour lesquels les essais cliniques sont déjà soit en phase finale (phase III) soit en cours (phases I ou II).

Des résultats préliminaires ont été publiés en 2022 pour des vaccins contre les virus du sida (HIV) et contre celui de la grippe saisonnière.

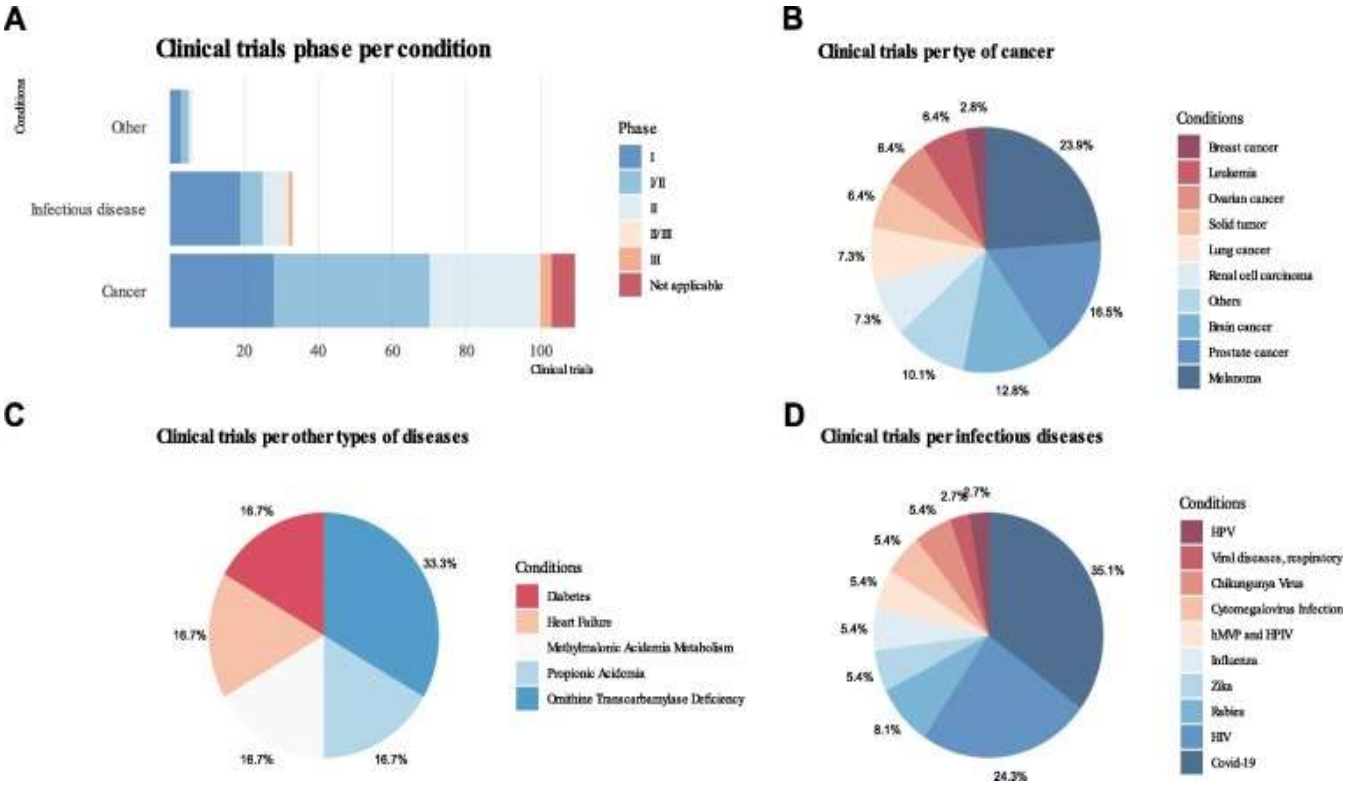

Figure 6 *: Distribution des essais cliniques réalisés ou en cours de réalisation selon https://clinicaltrials.gov/ et http://www.isrctn.com/ utilisant des vaccins basés sur la technologie ARNm. A : Essais cliniques par conditions et phase de test ; B : par types de cancer ; C : par autres types de maladie infectieuse ; D : Essais cliniques des vaccins contre les maladies infectieuses. (Voir référence 9)*

4.2 Reprogrammation développementale des cellules[12]

En 2012, Shinya Yamanaka a obtenu le Prix Nobel pour sa découverte du rôle de 4 facteurs protéiques (Oct 4, SOX 2, KLF 4 and c-Myc) dans la transformation de cellules somatiques comme les fibroblastes de la peau en cellules souches pluripotentes, c'est-à-dire capables de former un très grand nombre de tissus cellulaires différents.

Cette découverte a ouvert la porte à une source autologue de cellules souches pour la médecine régénérative, en évitant les questions éthiques posées par l'utilisation des cellules souches embryonnaires ou les problèmes d'ordre logistique associés à l'isolement des cellules souche mésenchymateuses.

Dans les travaux originaux, ces facteurs sont apportés dans les fibroblastes en utilisant un vecteur viral qui s'intègre dans le génome des cellules, ce qui interdit toute sorte d'application thérapeutique.

Bien que l'utilisation de systèmes d'expression transitoire aient beaucoup minimisé le risque de modification génétique des cellules toujours possible avec ce type de méthodes, l'utilisation de la technologie de transfert de l'ARNm semble parfaitement indiquée pour simplifier cette approche expérimentale.

Des preuves de concept ont été publiées, qui montrent que tel est bien le cas[13].

Conclusion

Le développement de la technologie basée sur l'ARN messager a mis trente ans pour être finalement mise au point et de très nombreuses personnes y ont contribué[14].

Associée aux développements de la biologie de synthèse qui permet de fabriquer n'importe quelle molécule d'ADN en très peu de temps, elle apporte un ensemble d'outils, qui en permettant de positionner directement des molécules d'ARM messager, simplifient considérablement les protocoles précédemment utilisés avec des protéines ou des molécules d'ADN, vont transformer la recherche fondamentale en sciences de la vie.

Le résultat d'un nombre toujours croissant d'essais précliniques ou cliniques démontre que la prophylaxie et la thérapie utilisant l'ARN messager seront de plus en plus utilisées pour prévenir les maladies infectieuses at pour le traitement des tumeurs cancéreuses.

Dans le domaine des applications thérapeutiques, sa plasticité et les facilités qu'elle apporte pour modifier rapidement les molécules d'ARN comme principes actifs, engendrent une nouvelle approche de la pharmacopée mais aussi des procédures réglementaires pour l'enregistrement des médicaments.

Enfin, de nouvelles pistes pour de nouvelles autres applications se font jour qui, après les technologies basées sur les protéines et l'ADN, ouvrent de grands espoirs pour l'ARN messager. On peut donc bien parler d'un nouveau paradigme de l'ARN.

[12] Pour un état de l'art sur cette question le lecteur pourra consulter Bulletin de l'Académie nationale de médecine 201(7-9):983-1018 , rapport commun de l'Académie des technologies et de l'Académie de médecine.
[13] Tissue Eng Part A. 2019 Jan 1; 25(1-2): 91–112.
[14] Nature 597, 318-324 (2021)