



HAL
open science

ARNm THÉRAPEUTIQUES

Bruno Pitard

► **To cite this version:**

Bruno Pitard. ARNm THÉRAPEUTIQUES. Encyclopædia Universalis, 2024, 978-2-34101-320-8; 154-166. inserm-04790082

HAL Id: inserm-04790082

<https://inserm.hal.science/inserm-04790082v1>

Submitted on 19 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ARN thérapeutiques

Un grand nombre de maladies, génétiques en particulier mais aussi acquises, pourraient être soignées si on pouvait introduire dans l'organisme, voire dans les cellules en cause, la ou les protéines capables de corriger l'anomalie à l'origine de la maladie. Face à ce besoin, on ne dispose que d'une centaine de produits biologiques (protéines et virus recombinants) dont l'usage est autorisé. La grande majorité des protéines reste ainsi inaccessible en tant que candidat-médicament. Cela tient au fait que tous les médicaments biologiques élaborés depuis 30 ans par la technologie dite de l'ADN recombinant, sont produits par fermentation de bactéries, levures ou cellules de mammifères dans lesquelles on a introduit le gène codant la protéine thérapeutique; l'extraction de cette dernière impose de coûteuses procédures de purification et de contrôle de qualité. La disparition de ces contraintes consiste à produire les protéines thérapeutiques directement chez le sujet à soigner en utilisant l'ADN du gène et surtout l'ARN messager codant la protéine d'intérêt. Cette possibilité existe depuis une dizaine d'années et a connu un premier succès avec les vaccins à ARNm contre le Covid-19. L'enjeu est désormais la généralisation de l'usage d'ARNm à des fins thérapeutiques.

Les avantages en seraient considérables. D'abord, l'ARNm de n'importe lequel des quelques 22 000 gènes codant les protéines du génome humain, peut être rapidement transformé en médicament biologique. Un tel ARNm peut être mis au point en quelques heures à quelques semaines seulement au laboratoire, ce qui permet d'économiser un temps précieux et des ressources de recherche et développement. Ce dernier point est particulièrement important dans le contexte du développement rapide d'une thérapeutique contre des maladies acquises, par exemple. Dans ce contexte, le développement d'une plateforme technologique d'ARNm qui se substituerait à une partie de la production pharmaceutique classique, devient une façon radicalement nouvelle de produire une classe de produits biologiques pour traiter les maladies héréditaires ou acquises. La preuve de l'efficacité des ARNm *in vivo* a été apportée par le succès des vaccins à ARNm. Leur plateforme technologique peut être adaptée à des fins thérapeutiques. Déjà, la preuve de concept de l'usage d'ARNm en thérapeutique a été apportée dans le cadre préclinique d'essais sur animaux. En cas de succès dans les essais cliniques humains de phase 3 en cours, cette avancée inaugurerait une méthode entièrement nouvelle de traitement médical: la biothérapie par ARN messager.

Cependant, le potentiel de cette nouvelle modalité thérapeutique suppose la résolution de plusieurs problèmes. Il passe d'abord par l'amélioration des systèmes de délivrance capables d'introduire l'ARNm dans le cytosol à l'intérieur des cellules cibles, là où il est activement exprimé en protéine: l'utilisation de l'ARNm repose ainsi sur des technologies de vectorisation. Si la plateforme technologique des vaccins à ARNm est un point de départ pour les développements thérapeutiques, une expression protéique forte est nécessaire pour ces dernières applications: il faut gagner un facteur de 100 à 1000 par rapport aux vaccins. Il faut en outre ne pas induire une réponse immunitaire contre la protéine exprimée, contrairement à ce qui est recherché pour les vaccins à ARNm. Dans cet objectif, il est indispensable de délivrer des molécules d'ARNm sans induire une réaction inflammatoire délétère. De ce fait, la mise au point d'une vectorisation intracellulaire efficace des ARNm

thérapeutiques contournant ces difficultés est la condition de l'exploitation du potentiel des molécules d'ARNm pour des applications autres que la vaccination.

Principe des ARNm thérapeutiques

Les molécules d'ARNm sont des chaînes linéaires de ribonucléotides (très semblables aux désoxyribonucléotides de l'ADN). Ce sont les copies exactes de l'ADN d'un gène et utilisent le même code génétique à quatre lettres (les quatre nucléotides), à la substitution près d'une uridine en place d'une thymine.

Un ARNm thérapeutique est construit à l'identique d'un ARNm vaccinal (figure). Il est issu de l'association de cinq éléments structuraux de fonctions différentes, que l'on construit par ingénierie moléculaire de l'ADN du gène d'intérêt, portée par un plasmide, mini chromosome circulaire dont l'ADN est facile à manipuler: la séquence nucléotidique codant la protéine « thérapeutique » est encadrée par des séquences non traduites situées aux extrémités 5' et 3', appelées en anglais *untranslated regions* (UTR). Ces séquences sont prélevées sur des ARNm particulièrement stables et longuement traduits dans une cellule, comme celui de la globine. On y ajoute une queue d'une centaine de ribonucléotides Adénosine à l'extrémité 3' de la séquence (poly-A), Cette construction est ensuite copiée industriellement en ARN un grand nombre de fois par un système enzymatique (une ARN polymérase) à partir du plasmide linéarisé. L'ARN ainsi produit est alors doté d'une coiffe à l'extrémité 5' (une base Guanine méthylée), protectrice et permettant le recrutement des ribosomes nécessaires à la synthèse de la protéine. L'ARNm produit final peut être alors directement décodé en protéine par la machinerie intracellulaire, une fois vectorisé à l'intérieur de la cellule.

Vectorisation des ARNm thérapeutiques

Les molécules d'ARNm sont fragiles, aisément dégradées, il faut les protéger des enzymes qui les détruisent. Cette protection est réalisée d'abord en utilisant des dérivés des ribonucléotides qui les rendent moins sensibles à ces enzymes, ensuite en les associant à des édifices multimoléculaires, appelés vecteurs. Ceux-ci en effet, doivent également permettre le passage de l'ARNm vers l'intérieur de la cellule. Ce voyage est semé d'obstacles, dont le contournement est réalisé grâce à plusieurs familles de vecteurs de comportement biologique différent.

Stabilisation des ARNm par les lipides cationiques

Les molécules d'ARNm sont 5 fois plus petites que les molécules d'ADN plasmidique utilisées pour exprimer un gène en ARNm. Par ailleurs, elles sont chargées négativement, comme tous les acides nucléiques, mais aussi comme tout l'environnement des cellules *in vivo*, au niveau de la matrice extracellulaire. En outre, la taille d'une molécule d'ARNm est quasiment aussi grande que celle de la cellule dans laquelle elle doit pénétrer. Enfin, l'ARNm est de même charge électrique que la surface des cellules. Tout ceci empêche, à la fois par excès de taille et par force de répulsion électrostatique, les molécules d'ARNm de pénétrer

spontanément dans les cellules. C'est dans ce contexte que se développe depuis 30 ans une activité de recherche visant à réduire la taille et inverser la charge des molécules d'ARNm pour les rendre compatibles avec leur internalisation. L'observation de la façon dont sont condensées les molécules d'acides nucléiques dans les noyaux cellulaires, comme dans la tête de spermatozoïdes, puis la connaissance fine de la composition lipidique des membranes cellulaires, ont guidé la construction des premiers vecteurs. Ils étaient conçus selon le prototype d'une molécule lipidique synthétique chargée positivement, ce qui lui permet de condenser l'ARNm chargé négativement. La présence de chaînes d'acides gras permet d'interagir avec les lipides de la membrane cellulaire. Cette classe de vecteurs a été appelée lipide chargé positivement, ou encore lipide cationique ou ionisable.

Historiquement, cette classe de lipides cationiques a été inventée dans les années 90 dans l'intention d'introduire de l'ADN puis des siRNA (petits ARN utilisés pour contrôler l'expression d'un gène), dans les cellules. Face à ce besoin de vecteurs adaptés, la chimie de synthèse des lipides s'est considérablement développée. La construction de l'un des plus importants, le lipide ionisable 1,2-dilinoleyl xy-N, N-diméthyl-3-aminopropane, une fois optimisé est devenu le lipide DLin-MC3-DMA, composé clef pour la vectorisation *in vivo* de siRNA vers le foie dans le médicament Onpattro®, qui permet de lutter contre l'Amylose héréditaire à transthyréline (premier médicament au monde à base d'ARN approuvé en 2018 par l'agence américaine du médicament, la Food and Drug Administration (FDA)). Des versions améliorées de ce lipide ont abouti aux lipides SM-102 et ALC-0315 utilisés respectivement dans les vaccins à ARNm contre le COVID-19 des sociétés Moderna et BioNtech.

Ces lipides ionisables sont chargés positivement lorsque le pH du milieu est acide et deviennent neutres au pH physiologique de 7,4. L'association des lipides ionisables avec l'ARN est donc réalisée à pH acide. La neutralité du complexe lipide/ARN lorsqu'il passe à un pH physiologique par exemple une fois injecté dans l'organisme, lui permet d'avoir une meilleure bio distribution systémique ou tissulaire et compatibilité avec les environnements biologiques.

Vecteurs nanoparticulaires.

L'étape suivante dans la mise au point de vecteurs efficaces, a consisté en la construction de nanoparticules lipidiques, appelées en anglais Lipid Nano Particles (LNP). Les LNP/mRNA ont une taille d'environ 100 nm de diamètre. Ils sont constitués par l'assemblage de plusieurs molécules lipidiques chimiquement différentes autour de l'ARNm. L'addition d'autres lipides est en effet nécessaire pour permettre au couple ARNm-lipide cationique de traverser la membrane cellulaire. Ces autres lipides sont neutres et sont majoritairement des composants ordinaires de la membrane cellulaire, phospholipides comme la phosphatidyl-choline, la phosphatidyl-ethanolamine, du cholestérol (qui contribue à la stabilité des particules en modulant la rigidité et l'intégrité des vésicules membranaires lipidiques que sont les nanoparticules), et un lipide fixé à des molécules de polyéthylène glycol (PEG, connu pour faciliter la diffusion des molécules organiques dans les tissus et les cellules). Les lipides-PEG confèrent de multiples propriétés aux nanoparticules. Leur quantité affecte la taille et la charge des particules. De plus, les lipides-PEG contribuent grandement à la stabilisation colloïdale des particules en créant une répulsion stérique

empêchant les particules de s'agréger entre elles. Ils peuvent être utilisés pour assurer un ciblage cellulaire précis après avoir greffés chimiquement à leur extrémité un ligand spécifique d'un récepteur situé sur la cellule que l'on veut cibler.

Une fois injectées dans l'organisme les nanoparticules interagissent avec la membrane des cellules cibles et y sont internalisées lors du renouvellement naturel de la membrane par endocytose non spécifique ou spécifique selon le cas. Le pH du compartiment endosomique où les LNP se retrouvent dans la cellule, est plus acide que celui de l'environnement extracellulaire. Les lipides ionisables vont redevenir chargés positivement ce qui va provoquer la déstabilisation de la membrane des endosomes et donc faciliter l'échappement de l'ARNm hors des endosomes. La déstabilisation de la membrane des endosomes est due à l'interaction électrostatique des lipides positifs des LNP avec un lipide négatif de la membrane interne des endosomes, la phosphatidylsérine. En outre les phospholipides utilisés ont tendance à adopter une structure en phase hexagonale inversée qui contribue à la déstabilisation des membranes. Ces mécanismes vont entraîner une rupture dans la continuité de la membrane de l'endosome, créant des passages vers le cytoplasme pour les molécules d'ARN débarrassés de leurs lipides. L'entrée dans les cellules par endocytose constitue cependant une étape limitante. En effet, peu de molécules d'ARNm vont sortir des endosomes pour rejoindre le cytoplasme ou se fera la traduction des ARNm en protéines thérapeutiques

Pour s'affranchir de cette étape limitante et augmenter l'efficacité de l'expression des ARNm, d'autres lipides cationiques à base de molécules naturelles comme les aminoglycosides commencent à être utilisés sans être mélangés avec d'autres lipides pour faire pénétrer des molécules d'ARNm à l'intérieur de la cellule.

Vecteurs copolymériques

Une autre classe de vecteurs, très différente des précédentes, est constituée par les « *block copolymers* ». Ce sont des édifices issus de l'association de macromolécules simultanément hydrophiles et hydrophobes (amphiphiles), qui s'associent autour d'une molécule centrale chargée positivement fixant l'ARNm (schéma). Différentes longueurs des segments hydrophobes et hydrophiles conduisent à des édifices plus hydrophobes ou plus hydrophiles. Les vecteurs plus hydrophobes ont plus d'affinité pour les membranes cellulaires ; au contraire les vecteurs plus hydrophiles vont être plus solubles dans les environnements aqueux. La formulation de ces vecteurs est beaucoup plus simple qu'avec les assemblages de quatre lipides utilisés pour former les LNP, puisqu'elle repose uniquement sur un mélange auto-associant de la solution aqueuse contenant l'ARNm et une autre les *block copolymers*. Cette association donne naissance à des organisations sub-nanoscopiques discrètes qui permettent un mécanisme d'internalisation dans les cellules en rupture d'avec celui décrit plus haut pour les complexes LNP/mRNA. L'ARNm en interaction avec les *block copolymers* ne va pas être internalisé par endocytose mais par un mécanisme de diffusion directe au travers de la membrane cellulaire, ce qui amène les molécules d'ARNm dans le cytosol et donc directement disponibles pour la traduction en protéine. Ce type de vecteur permet de contourner le facteur limitant dans la production de protéines thérapeutiques qu'est la sortie des endosomes pour l'entrée dans le cytoplasme.

Des vecteurs pour minimiser la réaction inflammatoire

Au contraire de la situation vaccinale, les molécules d'ARNm à usage thérapeutique doivent éviter de stimuler le système immunitaire inné. Ce dernier est en effet capable de détecter la présence d'ARN venant de l'extérieur de la cellule et déclencher une mécanique d'élimination de ce dernier ou du pathogène qui le porte. La conséquence d'une telle reconnaissance est une réaction inflammatoire, avec la diminution du niveau et de la durée d'expression de la protéine thérapeutique, ce qui est particulièrement gênant si l'administration de l'ARN médicament doit être répétée. Les trois catégories majeures de détection physiologique de la présence d'ARN exogène, correspondant aux moyens physiologiques de lutte contre les virus à ARN, sont : (1) la reconnaissance du nucléotide uridine sur la molécule d'ARN par le récepteur endosomique de type Pathogen Recognition Receptor (PPR) Toll like Receptor 7, (2) la reconnaissance d'un ARN double brin par le PRR cytoplasmique, la protéine MAD5 et (3) la reconnaissance de l'extrémité 5' coiffée de l'ARNm par le PRR cytoplasmique dit RIG-I. Les récepteurs cytoplasmiques ne semblent pas constituer un obstacle majeur : les ARNm thérapeutiques simple brin ne devraient en effet pas être reconnus par MAD5 sauf si les lipides des LNP leur font adopter une conformation en double brin ; RIG-I reconnaît surtout les ARN d'origine virale. Il n'en n'est pas de même pour les récepteurs endosomiques de l'immunité innée comme le TLR7, qui peuvent eux reconnaître les ARNm thérapeutiques même s'ils utilisent des bases uridine chimiquement modifiée, moins bien reconnues par TLR7. Dans ces conditions, l'utilisation des *block polymers* pour l'entrée directe de l'ARNm dans la cellule sans passer par la voie endocytaire, peut permettre de contourner la réponse immunitaire innée liée aux PPR des endosomes.

Modalités d'administration des ARNm thérapeutiques

Les différentes voies d'administration des ARNm vectorisés influencent leur distribution dans les organes, leur cinétique d'expression et leur effet thérapeutique. La voie d'administration est déterminée tant par les propriétés physico-chimiques des assemblages vecteurs synthétiques/ARNm que par l'application thérapeutique recherchée. Après injection par voie intraveineuse, la plupart des LNP s'accumulent dans le foie, où les particules sont internalisées dans les hépatocytes par endocytose. Ceci est dû au fait que l'apolipoprotéine E (ApoE) possède une affinité pour les lipides vecteurs de l'ARNm et que son récepteur est localisé sur les cellules hépatiques. La biodistribution préférentielle des LNP dans le foie se fait donc par ciblage actif. Comme le foie sécrète naturellement de nombreuses protéines, comme la plupart des protéines du sang, il peut être utilisé comme « usine » pour produire des protéines thérapeutiques manquantes dans le cadre de maladies métaboliques (par exemple tyrosinémie héréditaire de type I, porphyrie aigue intermittente, maladie de Fabry, syndrome de Grigler Najjar...) et hématologiques (par exemple hémophilie A, B...), ou encore d'anticorps pour neutraliser des pathogènes ou cibler des cellules cancéreuses. Cependant, ces nombreuses applications thérapeutiques potentielles ne prendront de l'ampleur que si la réponse immunitaire innée liée à la reconnaissance des molécules d'ARN est suffisamment atténuée. Cette réponse pourrait limiter par exemple la possibilité de répéter les administrations des LNP dans le temps, alors que cela peut s'avérer nécessaire dans le cadre d'une pathologie de déficit où la protéine thérapeutique doit être produite sur le long cours (risque de pathologie auto-immune liée à l'inflammation). Par ailleurs les LNP entraînés dans la circulation générale, peuvent s'accumuler dans de multiples ganglions lymphatique dans

l'ensemble du corps, ce qui peut induire une réponse immunitaire contre la protéine exprimée à partir de l'ARNm, ce qui est bénéfique dans la vaccination à ARNm mais défavorable pour la thérapie à ARNm.

L'administration topique d'ARNm a pour objectif d'obtenir un effet thérapeutique local, par injection dans des organes précis comme le cœur. Dans ce contexte, des essais cliniques de phase II sont conduits en utilisant des molécules d'ARNm sans vecteur. Il s'agit dans ce cas d'induire l'expression d'un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire dans le cœur d'individus ayant subi un infarctus du myocarde, pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins contournant les zones endommagées non-vascularisées. Une approche thérapeutique voisine avec cette fois-ci des molécules d'ADN, consiste à faire exprimer un facteur de vascularisation au niveau des membres inférieurs dans le cadre d'oblitération de la circulation sanguine (ischémie périphérique) : elle a débouché sur le premier médicament par expression d'une protéine thérapeutique, le Collatogene®.

Dans tous les cas connus, les limites de l'usage *in vivo* des vecteurs à base de particules lipidiques pour la thérapie à ARNm sont que l'on ne parvient pas encore à contrôler correctement la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire. C'est dans ce contexte qu'a été défini le concept d'utilisation de blocs de polymères amphiphiles et non de lipides, pour la vectorisation intracellulaire de molécules d'ARNm destinée à l'expression de protéines thérapeutiques sans stimuler la réponse immunitaire. La clef pour y parvenir peut être d'internaliser directement les molécules d'ARN dans le cytosol et non pas par un mécanisme d'endocytose.

Essais cliniques des ARNm thérapeutiques

La thérapie à ARNm nécessite une production de protéine thérapeutique beaucoup plus importante que celle de l'antigène vaccinal pour être efficace. Dans certains cas, des traitements longs avec des injections répétées seront nécessaires. Les difficultés discutées précédemment expliquent pourquoi cette modalité thérapeutique a progressé plus lentement que l'usage de l'ARNm vaccinal.

Les essais cliniques de thérapie par ARNm concernent plusieurs approches : thérapie de remplacement de protéines non-fonctionnelles dans le cadre des maladies génétiques, expression de protéines thérapeutiques comme des anticorps monoclonaux ou des cytokines (molécules impliquées dans la coopération entre cellules du système immunitaire) dans des maladies acquises, et des protéines impliquées dans l'édition de gènes (modification *in vivo* de l'ADN d'un gène) dont la plus connue est CRISPR.

Traitement des maladies génétiques

Les maladies génétiques sont dues à des mutations de l'ADN qui entraînent la production de protéines non-fonctionnelles ou une absence de leur synthèse. Même si dans certains cas des protéines thérapeutiques recombinantes peuvent traiter des symptômes cliniques, c'est par exemple le cas dans certaines hémophilies ou du diabète de type I, cela présente souvent des difficultés dans le traitement sur le long terme. C'est dans ce contexte que la thérapie à ARNm pour le remplacement de protéines non fonctionnelles ou absentes est

apparue comme une alternative prometteuse –et surtout plus générale- aux traitements par des protéines recombinantes.

Thérapies par remplacement. L'ARNm peut être traduit en la protéine désirée par les cellules du patient, y compris avec les modifications introduites après sa synthèse et qui sont nécessaires à sa fonction (addition de sucres, de divers groupements chimiques etc.). De plus, l'ARNm peut rétablir les différents types de protéines, sécrétées, intracellulaires et transmembranaires. Les essais cliniques de thérapie de remplacement de protéines utilisant des LNP/ARNm ont principalement été menés jusqu'à ce jour pour des maladies héréditaires affectant des enzymes du métabolisme général : déficit en ornithine transcarbamylase (qui se traduit par une accumulation d'ammoniaque dans le sang et un retard mental chez l'enfant), l'acidémie méthylmalonique (due à un déficit en l'enzyme méthylmalonyl CoA mutase et se traduisant également par une accumulation d'ammoniaque dans le sang, entraînant des séquelles neurologiques) et l'acidémie propionique (due au déficit de l'enzyme propionyl coenzyme A carboxylase, se traduisant par l'accumulation jusqu'à des niveaux toxiques d'acide propionique dans le sang). Ces maladies, dont les effets se manifestent très tôt après la naissance, sont caractérisées par des déficits d'enzymes clés qui conduisent à l'accumulation excessive de métabolites cause des signes cliniques. Par conséquent, l'ajout intracellulaire de ces enzymes par les formulations LNP/ARNm peut ralentir la progression des maladies.

Concernant plusieurs autres maladies métaboliques, le potentiel thérapeutique des thérapies de remplacement basées sur l'ARNm est testé dans des études précliniques non pas encore chez l'homme, mais sur des animaux modèles de ces maladies. Les thérapies de remplacement sont ainsi en essai clinique pour le traitement de la mucoviscidose. Les patients atteints de mucoviscidose souffrent d'infection pulmonaires répétées et de problèmes respiratoires chroniques dus au défaut de la protéine CFTR, un canal de transport des ions Cl⁻ inséré dans la membrane des cellules épithéliales. Des formulations lipidiques encapsulant l'ARNm de la protéine CFTR « normale », peut restaurer la sécrétion de chlore dans un modèle de souris chez qui le gène de CFTR a été invalidé. Un essai clinique évalue l'innocuité et la tolérance de particules lipide-mRNA nébulisées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose. Dans cet essai de phase I/II, on note que les formulations sont bien tolérées, mais avec des effets secondaires sérieux aux fortes doses. Une légère amélioration de la fonction respiratoire a été notée dans des résultats préliminaires, qui restent à confirmer.

Enfin, les thérapies de remplacement sont expérimentées dans des maladies hématologiques comme par exemple les hémophilies A et B (défaut de coagulation du sang) et le purpura thrombocytopénique (à l'origine de micro embolies dans l'ensemble du corps), des maladies du système nerveux central comme l'ataxie de Friedrich (liée au défaut d'une petite protéine mitochondriale qui perturbe le métabolisme du fer), des maladies de peau comme le déficit en élastine et des pertes auditives.

Thérapies par correction du gène muté. Au lieu de produire une protéine « normale » pour compenser le défaut génétique, il est devenu possible depuis une dizaine d'années, de corriger précisément le défaut lui-même dans le gène considéré. Cette procédure est appelée « édition du génome ». Les outils développés pour l'édition des gènes emploient des enzymes comme la nucléase Cas9. Les composants nécessaires à l'édition des gènes, à savoir la protéine Cas9 et son ARN guide ciblant le gène d'intérêt peuvent être introduits dans les cellules par des

formulations LNP/ARNm. La méthode est utilisée pour corriger des maladies génétiques. Cela inclut en particulier la tyrosinémie héréditaire de type I, l'hypercholestérolémie, des maladies du métabolisme des lipoprotéines et l'amylose à transthyréline, toutes tentatives validées en préclinique. L'amylose à transthyréline est une maladie à évolution lente caractérisée par le dépôt de substance amyloïde dans le système nerveux, entraînant des troubles des organes innervés par le système nerveux périphérique. Ces plaques sont liées au repliement anormal de la transthyréline, une protéine sécrétée exclusivement par le foie. Elle est due à une mutation du gène *TTR*. Un essai de phase I a été initié pour étudier l'innocuité, la pharmacocinétique et pharmacodynamique d'une formulation lipidique encapsulant les composants pour l'édition du gène *TTR*. L'objectif est ici de réduire la concentration circulante de la protéine mutée. Les résultats ont indiqué qu'après une injection systémique unique de LNP encapsulant l'ARNm codant Cas9 et son guide ARN, le gène codant la protéine mutée était clivé et qu'il en résultait une diminution de plus de 90% du taux circulant de protéine mutée. Ces résultats ont été facilités par le ciblage, *de facto*, des LNP aux cellules du foie. Parce que l'ARNm est seulement exprimé transitoirement, cette approche est vraisemblablement plus sûre que l'approche de thérapie génique utilisant un vecteur viral codant le même complexe, qui va persister longtemps après l'événement souhaité d'édition du gène cible. Cette étude démontre pour la première fois la possibilité de réaliser de l'édition de gène ciblée pour corriger une maladie génétique chez l'Homme, et ouvre la voie à l'extension potentielle de l'ARNm/ CRISPR thérapeutique pour les nombreuses maladies génétiques hépatiques liées à des défauts dans des enzymes impliquées dans le métabolisme et dans des maladies liées aux lipoprotéines

Applications en infectiologie et cancérologie. L'utilisation de l'ARNm thérapeutique est également envisagée dans des maladies autres que génétiques. La production d'anticorps monoclonaux destinés à neutraliser des cibles virales ou autres à partir de leurs molécules d'ARNm vectorisées, est un exemple de cette approche. Lorsqu'un tel anticorps monoclonal capable de neutraliser le virus Chikungunya est produit chez des volontaires sains par injection intraveineuses des complexes LNP/ARNm, des anticorps neutralisants sont décelés aux diverses doses utilisées. Cependant à la plus forte dose, des réactions secondaires liées à l'infusion des complexes lipides/ARNm, sont observées, mais qui restent contrôlables au prix d'une diminution du taux d'anticorps produits.

L'application des molécules d'ARNm à la production *in vivo* d'anticorps suscite un grand intérêt avec des collaborations entre industriels spécialistes d'un côté des anticorps thérapeutiques et de l'autre des ARN messagers. C'est dans ce contexte que sont conduits des essais précliniques chez les animaux pour faire exprimer des fragments d'anticorps contrôlant l'ovulation, à partir de molécules d'ARNm vectorisées par des *block copolymers*. Un autre exemple est l'expression de protéines immunostimulantes pour lutter contre le cancer. En effet une stratégie anti-tumorale consiste en l'injection d'ARNm codant des protéines qui vont avoir un effet thérapeutique direct, typiquement en stimulant le système immunitaire. Il s'agit soit de molécules de la surface des cellules immunocompétentes et leurs ligands, soit de molécules messagers contrôlant l'activation et la migration de ces cellules, interleukines et cytokines. En général, les essais cliniques évaluant cette approche, lui associent des anticorps recombinants dirigés contre des molécules qui contrôlent l'activation des lymphocytes tueurs

tels que des anticorps recombinants anti-PD1 ou PD-L1 et qui sont, eux, produits par fermentation industrielle. Il s'agit alors de potentialiser l'effet bien établi de ces derniers. De nombreux autres essais cliniques sont actuellement en cours dans ce domaine visant à la production de différentes cytokines comme IL23 et IL36 γ , impliquées dans l'inflammation, l'interféron IFN- α , le facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) etc. Ces essais sont menés avec des molécules d'ARNm vectorisées par des mélanges de lipides. Ils constituent une approche différente dans la lutte contre le cancer, complémentaire de l'immunothérapie classique, car les molécules d'ARNm sont injectées directement dans les tumeurs pour y faire exprimer ces protéines qui vont stimuler le système immunitaire inné. La logique est ici de lutter contre un environnement tumoral qui s'oppose à la réaction inflammatoire, précisément en facilitant une réaction inflammatoire, et ce afin de permettre aux lymphocytes tueurs d'avoir accès aux, et de détruire les, cellules tumorales. L'application aux vaccins anticancéreux, pourtant plus ancienne que pour les maladies infectieuses, n'a pas jusqu'à présent pas été particulièrement efficace, mais les résultats encourageants obtenus laissent entrevoir la possibilité que la combinaison d'une expression de la protéine tumorale (PSA-1 pour la prostate, Melan-A pour le mélanome) associée à la stimulation de l'immunité innée pourrait surmonter certains des obstacles rencontrés par les vaccins antérieurs. C'est en effet dans cette démarche de vaccination anti-cancer que l'exploitation des propriétés immunostimulantes de l'ARNm prend tout son sens grâce à la capacité intrinsèque de cette famille de molécules à activer les voies immunitaires innées, quelle que soit la protéine exprimée par l'ARNm. La réaction inflammatoire facilite en effet l'activation des lymphocytes T tueurs spécifiques de la tumeur.

Place de l'ARNm en médecine

L'émergence de l'ARNm comme une plateforme vaccinale sûre et efficace dans la course à la mise au point d'un vaccin contre le COVID 19, a démontré les bénéfices et les risques des formulations nanoparticules lipidiques/mRNA. Bien que beaucoup d'attention ait été portée à la rapidité de fabrication, aux conditions de stockage des vaccins ainsi que sur la correction de leurs effets secondaires, la communauté scientifique et médicale s'est projetée au-delà de ces premiers vaccins pour étendre l'utilisation de l'ARN messenger à des applications non seulement vaccinales mais aussi thérapeutiques. Certes il faudra augmenter l'efficacité d'expression au moins d'un facteur 1 000 par rapport celle obtenue pour un vaccin, pour atteindre une quantité de protéine thérapeutique efficace. Bien que ce problème ne soit pas encore complètement réglé, l'ARNm thérapeutique occupe déjà une place particulière entre la thérapie génique et le traitement par protéine recombinante. Il combine en effet beaucoup des avantages des deux tous en répondant aux problèmes rencontrés par l'une et l'autre. Par exemple, les protéines multimériques, composées de plusieurs sous-unités, posent des problèmes techniques insurmontables quant à leur production en fermenteur, mais peuvent tout à fait être produites par les cellules du patient lui-même par un ARNm ou par une combinaison de plusieurs ARNm codant les différentes sous-unités des protéines. Pour les maladies qui nécessitent un contrôle rigoureux du niveau et de la durée d'expression de la protéine, l'ARNm offre cette possibilité grâce à la maîtrise de la quantité d'ARNm injectée,

ce qui n'est pas facilement réalisable avec la thérapie génique à base d'ADN qui opère sur le long terme avec des niveaux d'expression peu prévisibles. L'usage d'ARNm limite ainsi les effets secondaires toxiques d'une surexpression de la protéine.

La durée d'expression intrinsèquement transitoire de la protéine d'intérêt thérapeutique positionne ainsi la thérapie à ARNm comme une modalité idéale pour des situations dans lesquelles un ou peu d'épisodes d'expression de protéines thérapeutiques sont nécessaires. La capacité de doser à plusieurs reprises, de varier le dosage ou l'intervalle entre injections offre au clinicien la flexibilité d'un traitement classique. Dans le cadre de l'utilisation de l'outil d'édition CRISPR, l'expression transitoire de la machinerie d'édition de gènes à partir de l'ARNm est attrayant pour réduire les effets secondaires de la persistance expression des nucléases dans le noyau cellulaire ou de coupures non-désirées de l'ADN génomique. Tout ceci représente en fait un choix attractif dans les cas pour lesquels les besoins des patients peuvent varier ou pour lesquels des hésitations peuvent exister par rapport à une indication de thérapie génique.

Le potentiel des thérapies par ARNm va s'étendre davantage grâce à l'évaluation de protéines modifiées pour leur conférer des propriétés nouvelles, ou de toutes nouvelles protéines disposant d'une longue durée d'action obtenue par fusion du domaine thérapeutique de la protéine avec un domaine augmentant sa demi-vie. Entièrement nouvelle est également la capacité d'exprimer des protéines thérapeutiques jusqu'ici inutilisables, comme par exemple des protéines intracellulaires ; c'est ce que qui est rendu possible dans le traitement de maladies génétiques. De plus, l'expression intracellulaire d'anticorps, de fragments d'anticorps ou d'autres motifs structuraux de liaison aux protéines fournissent une autre classe thérapeutique qui peut être associée à l'adressage à des domaines subcellulaires, comme par exemple, le noyau ou les mitochondries, ce afin d'obtenir la synthèse de la protéine codée par l'ARNm, là où son action est requise. Des avancées supplémentaires en efficacité et en ciblage des tissus et d'organes ouvrent les portes à de nouvelles applications thérapeutiques.

Quant à la réaction inflammatoire induite (qui peut se manifester de multiples façons : une réaction locale dans les cas d'injection intramusculaire ou sous-cutanée ou comme un syndrome fébrile plus généralisé ou une réaction pseudo-grippale), elle semble le plus souvent assez aisée à combattre par les procédures anti-inflammatoires classiques. Les données obtenues sur les vaccins, fournissent des informations intéressantes sur l'orientation de la recherche sur l'administration répétée d'ARNm thérapeutiques. Le problème est quelque peu compliqué par le fait que la majorité des applications d'ARNm impliquent des mélanges de lipides, qui peuvent contribuer à l'inflammation. Bien qu'une réaction inflammatoire transitoire soit acceptable dans le cadre d'une dose unique (vaccination) ou de maladies graves potentiellement mortelles (en oncologie), la sélection d'une formulation d'ARN appropriée et bien tolérée est essentielle pour les indications nécessitant un traitement au long cours. De même, l'accumulation des lipides synthétiques dans l'organisme, dans les tissus cibles ou non cibles, du fait d'injections répétées pourrait présenter des risques à long terme difficiles à prévoir.

La science de la formulation au sens pharmaceutique du terme, fait ainsi autant partie de l'avenir des thérapies par ARNm que la compréhension de la biologie de l'ARNm lui-même. Le développement de nouvelles génération de vecteurs synthétiques et d'ARNm sont ainsi nécessaires pour rendre « inerte immunologiquement » le médicament à administrer pour valider le champ des pathologies pouvant bénéficier de la thérapie à ARN et améliorer les traitements. Les *block copolymers* amphiphiles qui sont de nature chimique différente des LNP, car dépourvus de lipides et possédant un mécanisme d'internalisation en évitant l'entrée par endocytose, offrent une alternative non inflammatoire prometteuse. On peut penser que l'utilisation de l'ARNm en médecine passera par le développement de ce type de formulation.

PITARD
Bruno

Bibliographie

Rohner E, Yang R, Foo KS, Goedel A and Chien KR. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. (2022) *Nature Biotechnology* 40, 1586-1600

Gupta A, Andresen JL, Manan RS and Langer R. Nucleic acid delivery for therapeutic applications. (2021) *Adv Drug Deliv Rev* 178, 113834

Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. (2021) *Nat Rev Mater* 6, 1078-1094

Colombani T, Peuziat P, Dallet L, Haudebourg T, Mevel M, Berchel M, Lambert O., Habrant D, Pitard B. Self-assembling complexes binary mixtures of lipids with different linkers and nucleic acids promote universal mRNA, DNA and siRNA delivery. (2017) *J Control Release* 249, 131-142

Habrant D, Peuziat P, Colombani T, Dallet L, Gehin J, Goudeau E, Evrard B, Lambert O, Haudebourg T, Pitard B. Design of ionizable lipids to overcome the limiting step of endosomal escape: application in the intracellular delivery of mRNA, DNA and siRNA. (2016) *J Med Chem* 59, 3046-3062

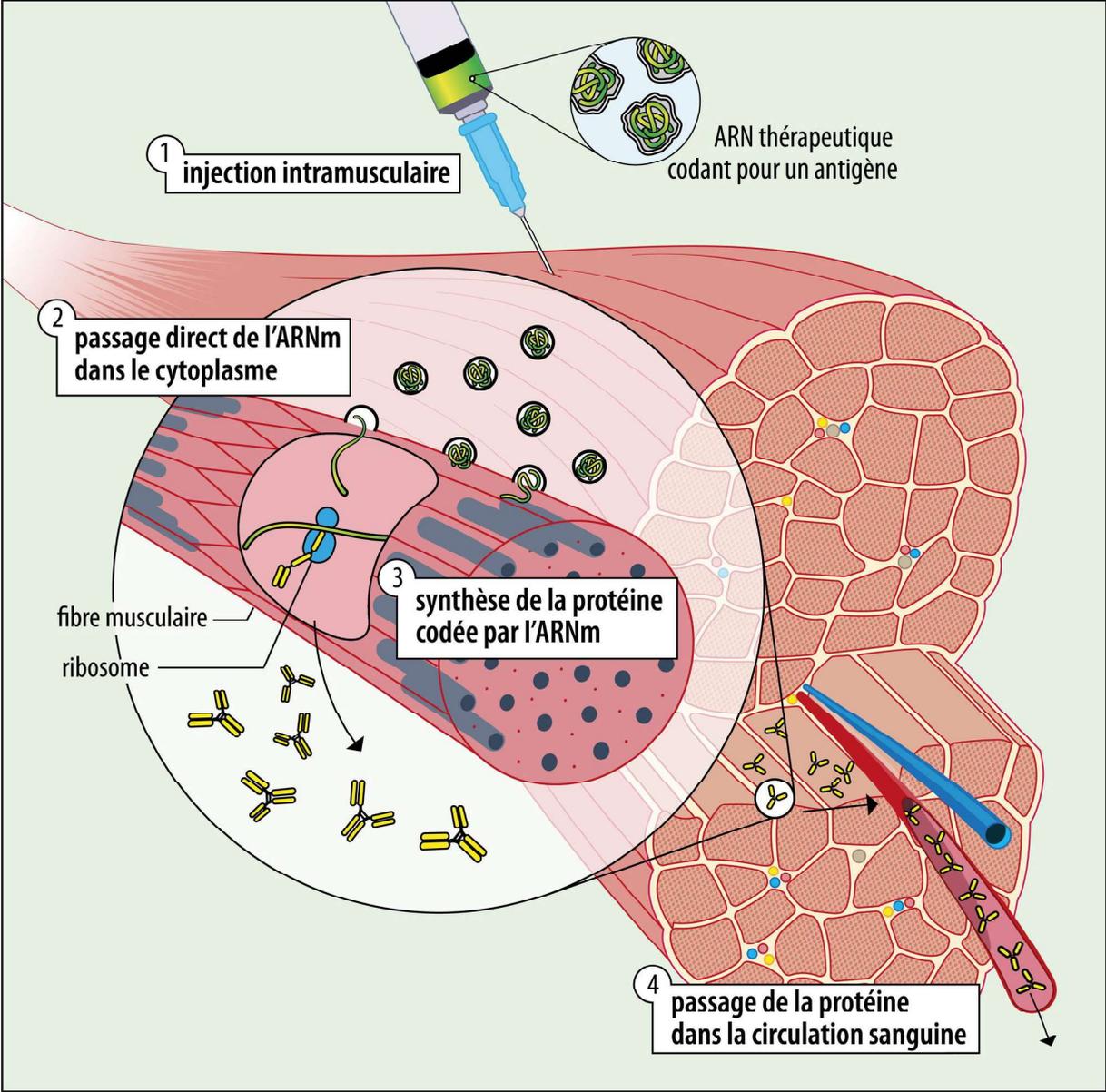
Pitard B and Habrant D. Supramolecular Gene Transfection Agents. *Comprehensive Supramolecular chemistry II*. (2017) 5, 365-389

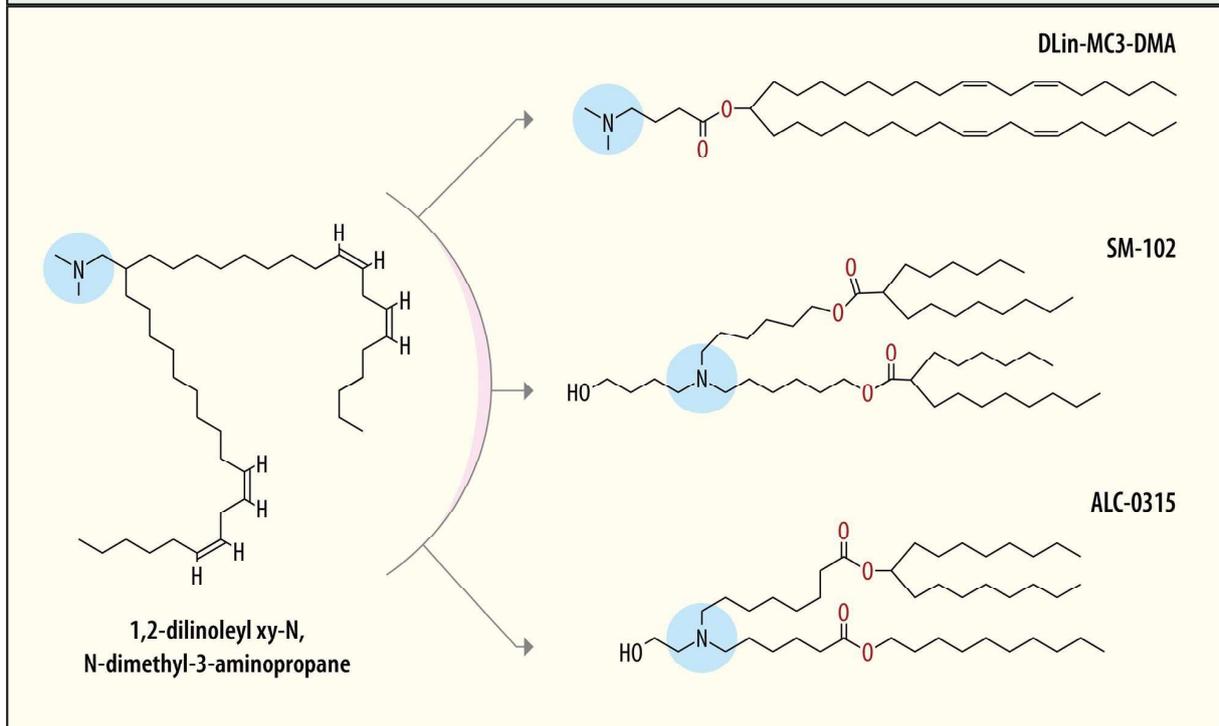
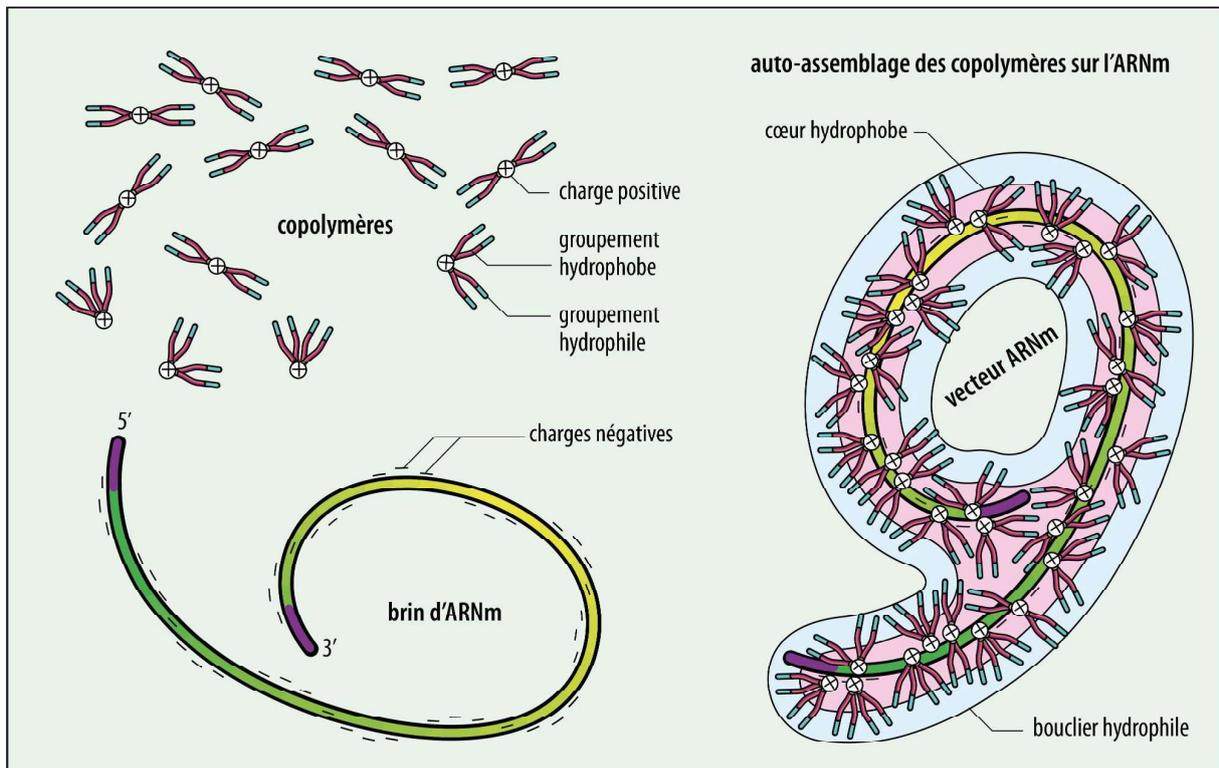
Pitard B. Capped and uncapped RNA molecules and Block copolymers for intracellular delivery of RNA. Patent (2022) US20220105203A1

Chèvre R, Le Bihan O, Beilvert F, Chatin B, Barteau B, Mevel M, Lambert O, and Pitard B. Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. (2011) *Nucleic Acids Res.* 39, 1610-1622

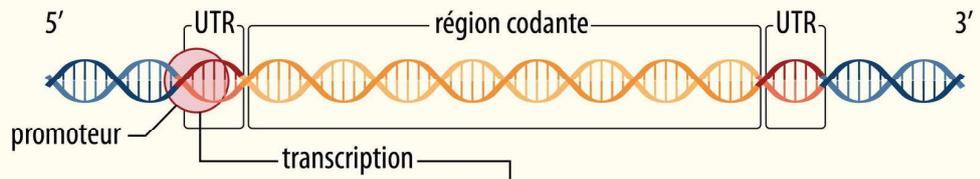
Lindsay KE, Bhosle SM, Zurla C, Beyersdorf J, Rogers KA, Vanover D, Xiao P, Araínga M, Shireff LM, Pitard B, Baumhof P, Villinger F, Santangelo PJ. Visualization of early events in

mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET/CT and near-infrared imaging. *Nat Biomed Eng.* (2019) 3:371-380



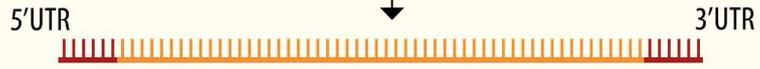


ADN plasmidique



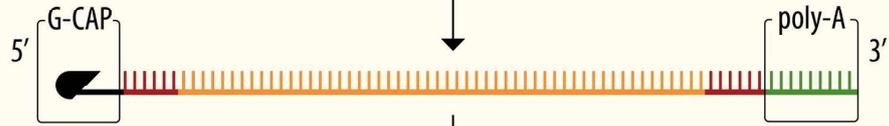
copie in vitro par ARN polymérase

ARN transcrit



addition in vitro de la coiffe et du poly-A

ARNm mature



formulation avec un vecteur