

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2023

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 8 avril 2013)

Présentée et soutenue publiquement
Le 26 Septembre 2023 à POITIERS
Par Madame **PROTEAU Sarah**

**Formulation d'ARN messenger pour une application à
la vaccination contre la maladie de Chagas**

Composition du jury :

Présidente : Pr PAGE Gylène

Membres : Dr GIRARDOT Marion
Dr ESCRIOU Virginie

Directrice de thèse : Pr FAVOT Laure

Liste des enseignants

Faculté de Médecine et Pharmacie de Poitiers

Année universitaire 2022 – 2023

SECTION PHARMACIE

Professeurs des universités-praticiens hospitaliers

- COUET William, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique – **Assesseur pédagogique pharmacie**
- FOUCHER Yohann, santé publique, biostatistiques et épidémiologie
- MARCHAND Sandrine, pharmacologie, pharmacocinétique
- RAGOT Stéphanie, santé publique

Professeurs des universités

- BODET Charles, microbiologie
- CARATO Pascal, chimie thérapeutique
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie
- IMBERT Christine, parasitologie et mycologie médicale
- OLIVIER Jean-Christophe, pharmacie galénique, biopharmacie et pharmacie industrielle
- PAGE Guylène, biologie cellulaire, biothérapeutiques
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique
- SARROUILHE Denis, physiologie humaine – **Directeur de la section pharmacie**

Maîtres de conférences des universités-praticiens hospitaliers

- BARRA Anne, immuno-hématologie
- BINSON Guillaume, pharmacie clinique
- THEVENOT Sarah, hygiène, hydrologie et environnement

Maîtres de conférences

- BARRIER Laurence, biochimie générale et clinique
- BON Delphine, biophysique
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, microbiologie (HDR)
- CHAUZY Alexia, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, chimie analytique
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie et pharmacométrie (HDR)
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, pharmacochimie (HDR)
- PAIN Stéphanie, toxicologie (HDR)
- PINET Caroline, physiologie, anatomie humaine
- RIOUX-BILAN Agnès, biochimie – **Référente CNAES – Responsable du dispositif COME'in**
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacotechnie (HDR)
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire et moléculaire
- WAHL Anne, phytothérapie, herborisation, aromathérapie

Maîtres de conférences associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Enseignement de l'anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Remerciements

Je tiens à remercier Dr FAVOT Laure qui m'a encadrée tout au long de la rédaction de cette thèse et qui m'a apporté son soutien, ses conseils et ses encouragements.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble de l'équipe Biothérapies du laboratoire U.T.C.B.S. de l'Université de Paris, particulièrement Dr ESCRIOU Virginie et Dr BIGEY Pascal. Merci pour votre accueil et votre encadrement durant ce stage, merci d'avoir pris le temps de m'épauler dans la compréhension du sujet, la réalisation des expériences et l'analyse des résultats et enfin merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury aujourd'hui. Merci au reste de l'équipe, Céline HOFFMANN, Anne Marie LACHAGES, Rita DACLAT, Hélène DEMORY, Angelita REBOLLO pour vos échanges et conseils instructifs concernant les expériences et avec qui j'ai pu passer des moments agréables tout au long de ce stage.

En plus du Dr FAVOT, je souhaite ajouter un remerciement tout particulier à deux autres enseignantes ayant contribué de manière importante au déroulé de mes études de pharmacie et qui me font l'honneur aujourd'hui de participer au jury de cette thèse. Dr Page, merci d'avoir mis en place le parcours recherche, ce qui m'a permis de trouver ma voie et d'avoir eu accès à ces enseignements spécialisés qui aujourd'hui m'ouvrent la porte à la thèse de science. Dr Girardot, merci pour vos enseignements et merci de m'avoir apporté au travers de votre rôle d'enseignante référente, un suivi, vos conseils et votre soutien tout au long de ces années.

Un grand merci à ma famille, Papa, Maman, Quentin et Floriane d'avoir été là pour moi pendant toutes ces années d'études et de m'avoir soutenue. Merci pour votre confiance et vos encouragements qui m'ont portée et beaucoup aidée.

Matej, je n'aurais jamais assez de mots pour te remercier pour ces nombreuses années à tes côtés, merci de croire en moi et de me soutenir.

A ma Laura, à notre rencontre sur les bancs de PACES, à nos longues journées à la BU durant cette pire année et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui, un énorme merci pour ton soutien depuis le tout début et surtout pour tous les bons moments passés en ta présence tout au long des années suivantes. Je suis fière de toi.

A Mélanie alias la meilleure binôme de PS, un grand merci pour toutes ces soirées pâtes carbo/révisions, à ces heures passées à la BU, à notre vie parisienne pleine de rugby et de roues. Merci aux super copines qui m'ont apportées de la joie et des rires durant mes années d'études Pictaves, un grand merci je vous aime fort Vinciane, Adèle, Amanda, Lucie et Alexandra.

Enfin, merci à l'ensemble de mes deux super promo *Pharmacie Poitiers 2022* et *M2 BME 2022* pour votre accompagnement et je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Table des matières

LISTE DES ENSEIGNANTS	3
PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS	3
PROFESSEURS DES UNIVERSITES	3
MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS	3
MAITRES DE CONFERENCES	3
MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES - OFFICINE	3
ENSEIGNEMENT DE L'ANGLAIS	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
PREAMBULE :	14
GENERALITES	16
1. LA MALADIE DE CHAGAS	16
1.1. <i>Epidémiologie de la maladie de Chagas</i>	16
1.2. <i>Cycle de vie de Trypanosoma cruzi</i>	16
1.3. <i>Symptômes de la maladie de Chagas</i>	18
1.4. <i>Physiopathologie de la maladie de Chagas</i>	19
1.5. <i>Diagnostic de la maladie de Chagas</i>	20
1.6. <i>Traitement de la maladie de Chagas</i>	20
1.7. <i>Développement d'un vaccin contre la maladie de Chagas</i>	21
2. LA VACCINATION	23
2.1. <i>Histoire de la vaccination</i>	23
2.2. <i>Les différents types de vaccins</i>	25
2.3. <i>Le fonctionnement de la réaction immunitaire aux vaccins</i>	26
3. L'ARN MESSAGER	28
3.1. <i>La molécule d'ARN</i>	28
3.2. <i>L'ARN messenger</i>	28
3.3. <i>Structure de l'ARNm endogène</i>	29
3.4. <i>Fonctionnement de la traduction protéique</i>	30
3.5. <i>Synthèse d'ARNm synthétique ou exogène :</i>	30

4.	VACCINS A ACIDES NUCLEIQUES	32
4.1.	<i>Les vaccins à ADN</i>	32
4.2.	<i>Les vaccins à ARNm</i>	32
4.3.	<i>Immunogénicité de la molécule d'ARNm</i>	38
4.4.	<i>Comparaison avec les vaccins conventionnels</i>	39
5.	VECTEURS :.....	41
5.1.	<i>Le rôle du vecteur</i>	41
5.2.	<i>Les vecteurs viraux</i>	42
5.3.	<i>Les vecteurs peptidiques</i>	42
5.4.	<i>Les vecteurs polymériques</i>	43
5.5.	<i>Les vecteurs lipidiques</i>	45
5.6.	<i>Les combinaisons de vecteurs</i>	48
5.7.	<i>Utilisation en clinique aujourd'hui</i>	49
PARTIE EXPERIMENTALE.....		52
1.	OBJECTIFS DU PROJET :.....	52
1.1.	<i>Formulation d'ARNm</i>	52
1.2.	<i>Application à la vaccination contre la maladie de Chagas</i>	53
2.	MATERIEL ET METHODE	54
2.1.	<i>Synthèse d'ARNm</i>	54
2.2.	<i>Préparation de liposomes cationiques</i>	55
2.3.	<i>Plasmides</i> :.....	57
2.4.	<i>ARNm</i>	58
2.5.	<i>Lipoplexes</i>	59
2.6.	<i>Culture cellulaire</i>	60
2.7.	<i>Transfections</i>	60
2.8.	<i>Analyse de l'efficacité de transfection</i>	61
2.9.	<i>Test de viabilité cellulaire</i>	62
2.10.	<i>Transfection In-Vivo</i>	63
2.11.	<i>Analyse statistique</i>	63
3.	RESULTATS.....	64
3.1.	<i>Synthèse in vitro d'ARNm</i>	64
3.2.	<i>Transfections in vitro</i>	64
3.3.	<i>Transfections In-Vivo</i>	72
3.4.	<i>Evaluation de la toxicité cellulaire de la protéine Chagas</i>	75
DISCUSSION.....		80
1.	DISCUSSION DES RESULTATS	80
1.1.	<i>Transfections in-vitro</i>	80

1.2. <i>Transfections in-vivo</i>	82
1.3. <i>Peptide Chagas</i>	82
2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	84
3. LES CHALLENGES DE LA VACCINATION :	84
BIBLIOGRAPHIE:	87
ANNEXES :	92
1. CARTE DU PLASMIDE PUC-MRNA	92
2. CARTE DU PLASMIDE PEGFP	93
3. CARTE DU PLASMIDE PVAX	94
SERMENT DE GALIEN	95
RESUME	96

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figure 2 : Structure de l'ARNm et étapes de transcription et de traduction	29
Figure 3 : Modifications de l'ARNm pour une application thérapeutique	34
Figure 4 : Structure de coiffes modifiées d'ARNm	35
Figure 5 : Structure des nucléotides modifiés.....	37
Figure 6 : Schéma représentant l'activation du système immunitaire par un vaccin à ARN.....	40
Figure 7 : Représentation du PEI.....	44
Figure 8 : Représentation de Poly-L-Arginine et Poly-L-Lysine.....	45
Figure 9 : Représentation structurelle d'un lipide cationique.....	46
Figure 10 : Représentation structurelle d'un lipide neutre.....	46
Figure 11 : Différentes optimisations possible dans le développement de liposomes.....	49
Figure 12 : Représentation schématique de la production de liposomes cationiques.....	55
Figure 13 : Lipides utilisés dans ce projet.....	56
Figure 14 : Représentation schématique de la transfection de lipoplexes.....	60
Figure 15 : Activité luciférase en coups par seconde par μg de protéines.....	65
Figure 16 : Expression de fluorescence verte observée au cytomètre en flux	67
Figure 17 : Activité luciférase en coups par seconde par μg de protéines.....	69
Figure 18 : Activité luciférase en coups par seconde par μg de protéines.....	71
Figure 19 : Transfections in vivo de plasmides exprimant la luciférase	72
Figure 20: Transfections in vivo d'ARNm exprimant la luciférase	73
Figure 21: Transfections in vivo d'ARNm exprimant la luciférase	74
Figure 22 : Pourcentage de viabilité cellulaire après transfection.....	78

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification des différents types de vaccins</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 2 : Liste des ARNm utilisés dans le cadre de ce projet</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 3 : Observation visuelle de la toxicité cellulaire résultant de transfections.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 4 : Quantité d'ADN transfecté entraînant une survie de 50% des cellules</i>	<i>79</i>

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARCA :	Anti-Reverse-Cap Analogue
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomal
ARNt :	Acide Ribonucléique de transfert
BCG :	Bacille de Calmette et Guerin
BCR :	B Cells Receptor ou Récepteur des lymphocytes B
BSA :	Bovine Serum Albumine ou Albumine de sérum bovin
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPP :	Cell Penetrating Peptide ou Peptide pénétrant les cellules
DMAPAP :	d(2-{3-[bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecylcarbamoyl methyl-acetamide)
DOPE :	dioleoylphosphatidylethanolamine
DOTAP :	1,2-dioleoyloxy3-trimethylammonium propane
DSPC :	1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
ECG :	Electrocardiogramme
FDA :	Food and Drugs Administration
GFP :	Green Fluorescent Protein ou Protéine fluorescente en vert
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
IM :	Intra-musculaire

IRES :	Internal Ribosome Entry Site
LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
MTT :	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NLS :	Nuclear Localization Sequence ou Signal de localisation nucléaire
NTP :	Nucléotides-Tri-Phosphates
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF :	Open Reading Frame ou Cadre de Lecture Ouvert
PCR :	Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérase en Chaîne
PEG :	Polyéthylèneglycol
PEI :	Polyéthylèneimine
PRR :	Pattern Recognition Receptors ou récepteurs de reconnaissance moléculaires
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TCR :	T Cells Receptor ou Récepteur des lymphocytes T
TLR :	Toll-Like Receptors
UTR :	UnTranslated region ou Région Non Traduite
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Préambule :

La rédaction de cette thèse d'exercice s'inscrit dans la continuité du stage d'application de DFASP2 que j'ai effectué d'Avril à Aout 2021, sous la direction du Dr BIGEY Pascal, au sein du laboratoire Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, (U.T.C.B.S.), une unité de recherche mixte avec le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR 8258), l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U1267), et l'Université Paris Cité. Spécialisé dans les technologies innovantes, telles que le développement de nouvelles formulations de biomédicaments, le laboratoire se compose de trois équipes : « *Vecteurs* », « *Immunologie* » ainsi que l'équipe « *Biothérapies* » qui m'a accueillie, dirigée par le Dr ESCRIOU Virginie.

Ce stage d'une durée de 5 mois s'intégrait dans un projet de recherche portant sur le développement de stratégies de vectorisation d'acide ribonucléique messager (ARNm) dans des applications de vaccination contre des maladies infectieuses, parmi lesquelles se trouve la Maladie de Chagas.

Dans un premier temps, je vais développer les notions clés entourant ce projet, en particulier la maladie de Chagas, la vaccination, ainsi que l'utilisation de l'ARNm. Dans un deuxième temps je présenterai les travaux réalisés durant ce stage, qui répondent à deux grandes thématiques du projet qui sont la vectorisation d'ARNm et l'immunisation envers l'agent responsable de la maladie de Chagas.

1. La maladie de Chagas

1.1. Epidémiologie de la maladie de Chagas

La maladie de Chagas, aussi appelée Trypanosomiase Américaine, est causée par le parasite protozoaire *Trypanosoma cruzi* et affecte entre huit et dix millions de personnes dans le monde entier¹. L'infection est majoritairement due à un vecteur de la famille des réduves, le triatome, et se produit par contact avec les déjections de l'insecte au niveau de la pique ou des muqueuses¹. Présents dans 21 pays endémiques tous situés sur le continent américain, majoritairement en Amérique latine, les réservoirs de vecteurs se trouvaient initialement dans les maisons construites en murs de terres et toits de chaume des espaces ruraux d'Amérique Latine². Aujourd'hui, la contamination s'effectue aussi par ingestion de nourriture ou boissons contaminées par des fèces du vecteur dans les pays où il est présent². De nombreuses actions nationales et internationales ont été entreprises dans les états d'Amérique Latine afin d'entraîner l'élimination des vecteurs domestiques³.

Les migrations de populations infectées issues d'Amérique Latine, ont entraîné le déplacement de cette infection dans des pays non-endémiques comme les États-Unis ou encore d'autres pays d'Europe⁴. En effet, des moyens de contaminations indépendants de la présence du vecteur favorisent aujourd'hui encore l'expansion de la maladie comme les transfusions sanguines, les transplantations d'organes ou de moelle osseuse, ou encore les transmissions congénitales durant la grossesse².

1.2. Cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi est présent chez l'homme sous deux formes : trypomastigote et amastigote. La forme trypomastigote correspond au stade infectieux et c'est celle que l'on va retrouver chez le vecteur, le triatome. La forme amastigote est une forme intracellulaire dans laquelle le parasite va se multiplier. Dans un premier temps, le triatome va ingérer des trypomastigotes lors d'un repas de sang, ceux-ci vont ensuite se différencier dans le système

digestif jusqu'à être sous la forme de trypomastigotes métacycliques au niveau du rectum. Les parasites seront ensuite éliminés dans les fèces à la suite d'un autre repas de sang du triatome et vont infecter l'organisme du mammifère piqué, au niveau de la plaie de la piqure ou des membranes des muqueuses telles que les conjonctives par exemple.

Une fois dans l'organisme, le parasite va pénétrer dans des cellules autour du site d'infection, s'y transformer en amastigote pour se multiplier. Une fois cette multiplication intracellulaire effectuée, le parasite va ressortir de la cellule et reprendre une forme trypomastigote. Cette forme étant flagellée, elle va circuler dans l'organisme, et diffuser l'infection en pénétrant dans de nouvelles cellules pour s'y multiplier. Enfin, c'est sous cette forme trypomastigote que le parasite sera de nouveau ingéré par un triatome et que le cycle d'infection recommencera (Figure 1)^{4,5}.

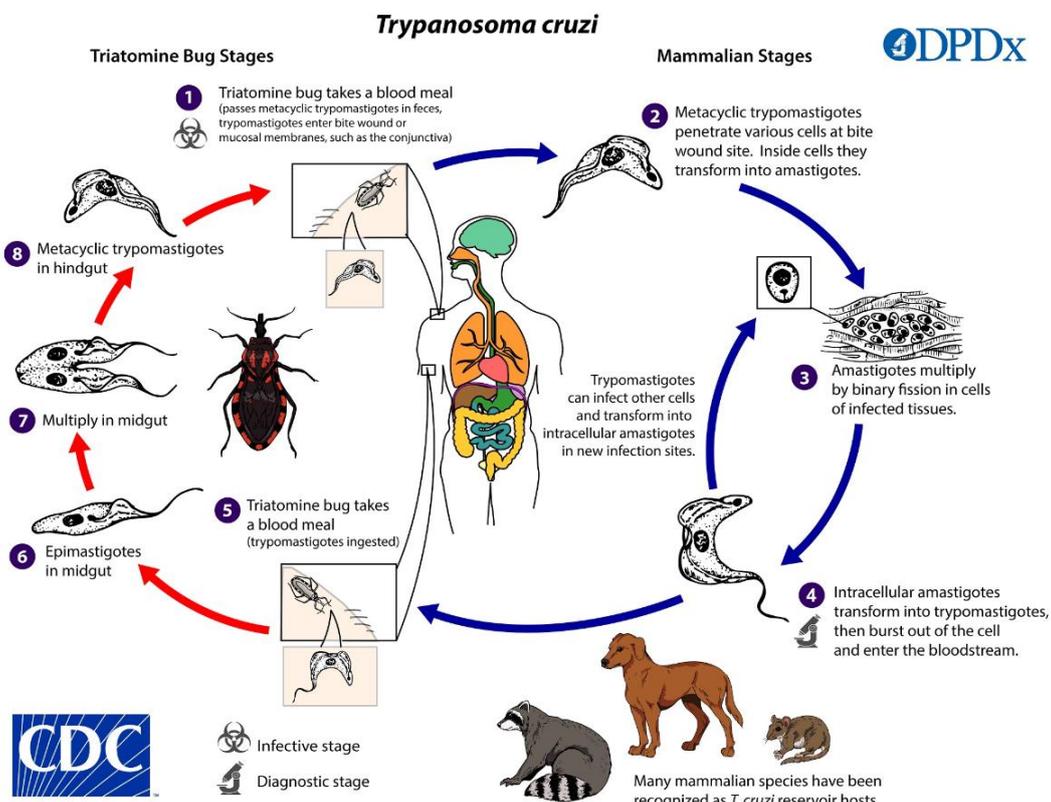


Figure 1 : Cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*.

Schéma représentant le cycle de vie du parasite responsable de la maladie de Chagas, ses différents états ainsi que les principaux hôtes favorisant sa dissémination. Le schéma est issu du site CDC : *Centers for Disease Control and prevention*⁶.

1.3. Symptômes de la maladie de Chagas

Les symptômes de la phase d'infection aiguë sont différents selon la voie de transmission. Pour les cas de **transmission par voie cutanée** après une piqûre de triatome, la phase d'incubation dure entre une et deux semaines. S'ensuit une phase aiguë généralement asymptomatique ou caractérisée par des symptômes faibles et non spécifiques tels qu'une fièvre persistante, une hépatosplénomégalie, une inflammation au point d'entrée, une lésion cutanée ou un œdème des paupières appelée « signe de Romana » si l'entrée s'est effectuée au niveau de la muqueuse conjonctivale. Dans de rares cas, il peut être observé une méningoencéphalite ou une myocardite.

Pour les cas **d'infection congénitale**, la phase d'incubation peut durer jusqu'à plusieurs semaines après la naissance. La phase d'infection aiguë est généralement asymptomatique ou peut être définie par les symptômes suivants : Naissance prématurée, mort néonatale, fièvre, syndrome de détresse respiratoire, myocardite ou méningoencéphalite.

Pour les cas d'infection par **ingestion d'aliments contaminés** par des fèces de triatome, la phase d'incubation peut durer entre trois et vingt-deux jours. Les symptômes liés à la phase aiguë de l'infection sont les suivants : fièvre, dyspnée, myalgie, toux, hépatosplénomégalie, hémorragie digestive ou encore des douleurs abdominales.

Les cas d'infections faisant suite à une **transfusion** de sang ou une **transplantation** d'organe contaminé présentent les mêmes signes cliniques de la forme d'infection vectorielle sans présenter les symptômes cutanés, liés à la porte d'entrée. La phase d'incubation peut durer entre huit jours et six mois suivant la transfusion ou la transplantation.

Les symptômes liés à l'infection aiguë se résolvent généralement seuls et, en l'absence de traitement, l'infection évolue vers une phase chronique qui dure toute la vie. La plupart des infections ne développent pas d'atteinte viscérales ce qui correspond à la forme indéterminée, asymptomatique. Certaines infections peuvent évoluer vers une forme cardiopulmonaire avec les symptômes suivants : Fatigue, syncope, palpitations, vertiges, dyspnées, œdèmes, dysfonction ventriculaire gauche, allant jusqu'à une insuffisance cardiaque nécessitant une greffe de cœur. Une forme gastro-intestinale peut aussi avoir lieu, elle se caractérise par des dysphagies, des régurgitations, des constipations, et des dilatations de l'œsophage et/ou du colon⁷.

1.4. Physiopathologie de la maladie de Chagas

La physiopathologie de la maladie de Chagas n'est pas encore complètement élucidée à l'heure actuelle car elle est liée à la variabilité de l'association entre l'hôte (susceptibilité génétique) et le parasite (virulence, souche...)⁸.

Lors de la phase aiguë de l'infection, les dommages tissulaires sont liés à la multiplication directe des parasites. En effet, des nids d'amastigotes sont retrouvés dans les tissus des muscles cardiaques, ou du système digestif, dans le système nerveux central, dans les ganglions lymphatiques, ou encore dans les gonades par exemple^{4,9}.

Jusqu'à récemment, l'hypothèse majeure expliquant la forme cardiaque de la phase chronique était un mécanisme d'auto-immunité lié à la présence d'auto-antigènes provoquant une réaction croisée avec des antigènes spécifique de *T. cruzi*⁴. Cette réaction immunitaire induite par le parasite contre des protéines de l'organisme hôte a une importance majeure dans la pathologie cardiaque sans que son rôle ne soit complètement compris¹⁰, faisant émettre l'hypothèse que cette auto-immunité serait éventuellement une conséquence plutôt qu'une cause de l'atteinte cardiaque¹¹. Le consensus actuel penche vers une balance entre la réponse immunitaire de l'hôte et la persistance du parasite⁴.

La réponse immunitaire de l'hôte est activée par le développement d'un micro-environnement inflammatoire de l'immunité innée avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron γ et le facteur de nécrose tumorale $\alpha^{2,4}$. Cette réaction, joue un rôle crucial dans la progression de la pathologie, tant dans la phase aiguë, pour le contrôle du parasite, que dans la phase chronique, pour la progression de la cardiopathie⁴. En effet, cette inflammation continue induit une fibrose et du stress oxydatif qui entraînent des dommages tissulaires du myocarde allant jusqu'à l'insuffisance cardiaque⁸.

Enfin, la pathologie gastro-intestinale chronique se développe suite à la destruction de neurones du système nerveux entérique ce qui entraîne des dysfonctions péristaltiques et mégaviscérales⁹.

1.5. Diagnostic de la maladie de Chagas

Le diagnostic de la phase aiguë s'effectue en général par la mise en évidence de trypanostigotes dans le sang ou plus rarement dans le fluide cébrospinal. Cet examen direct se fait sur un frottis sanguin de sang frais ou coloré au Giemsa⁴. Cependant, plus de 99% des infections ne sont pas détectées lors de la phase aiguë². Concernant les méthodes de diagnostic indirectes, la détection d'acide désoxyribonucléique (ADN) parasitaire par réaction de polymérase en chaîne (PCR) se révèle être un outil utile de dépistage précoce^{2,4}.

Lors de la phase chronique, la parasitémie est faible ce qui rend l'analyse par frottis sanguin difficile. Le diagnostic de cette phase s'effectue via la mise en évidence d'anticorps dirigés contre des antigènes de *T. cruzi* par au moins deux tests sérologiques¹².

Pour dépister la pathologie cardiaque il est recommandé d'effectuer un électrocardiogramme (ECG) ainsi qu'une échographie même chez des patients asymptomatiques⁴. La pathologie gastro-intestinale quant à elle, peut être diagnostiquée après une analyse du transit œsogastroduodénal ou un lavement baryté selon la clinique⁴.

1.6. Traitement de la maladie de Chagas

Deux molécules sont disponibles actuellement pour traiter les patients atteints de la maladie de Chagas : le benznidazole et le nifurtimox, cependant leurs profils de sécurité et d'efficacité ne sont pas idéaux⁴. En effet, ils sont peu efficaces pour traiter des patients en phase chronique et très mal tolérés, principalement chez les adultes.

L'administration de ces traitements en phase aiguë, permet d'améliorer les symptômes, de diminuer la parasitémie, de prévenir l'apparition de formes graves pour les patients immunodéprimés¹³. Cependant, le traitement de la phase chronique ne montre pas d'effet curatif, en particulier pour les atteintes viscérales (cardiaque et gastro-intestinale)¹³, c'est pourquoi il n'est recommandé que chez les enfants de moins de 18 ans. Les traitements ne sont pas recommandés pendant la grossesse¹³, cependant le traitement des femmes en âge de procréer permet de réduire le risque de transmission verticale⁴.

Le benznidazole est recommandé en première ligne pour le traitement des phases aiguës, ainsi qu'en prévention des transmissions congénitales. Le nifurtimox n'est recommandé qu'en seconde ligne de traitement car il est moins bien toléré que le benznidazole. Les effets indésirables majoritaires de ces deux molécules sont semblables: éruptions cutanées, troubles gastro-intestinaux (nausées, douleurs abdominales, anorexie...), céphalées, fièvre, neuropathies périphériques, neutropénies, lymphopénies¹³. La survenue de certains de ces symptômes peut entraîner l'arrêt immédiat du traitement.

Ces traitements sont peu efficaces dans la phase chronique qui est pourtant la phase majoritaire au moment du diagnostic. De plus, leur toxicité augmente avec l'âge et chez l'adulte les effets indésirables sont parfois plus élevés que les bénéfices obtenus. C'est pourquoi il existe un besoin de développer de nouveaux traitements afin de prévenir et/ou guérir cette maladie.

1.7. Développement d'un vaccin contre la maladie de Chagas

L'infection aiguë étant difficile à diagnostiquer car elle ne présente que peu de symptômes¹, et l'efficacité des traitements qui diminue avec le temps d'infection¹³, entraînent un besoin important de développer rapidement un vaccin qui permettrait de prévenir l'infection, de réduire l'épidémie et de diminuer la sévérité des symptômes¹⁴. De plus, associer un vaccin avec les traitements existants aujourd'hui permettrait de réduire la dose nécessaire de ces médicaments et réduirait de ce fait les effets indésirables observés. Diminuer la dose ainsi que la toxicité associée aux traitements rendrait les patients plus observants, ce qui augmenterait la survie générale¹⁵.

Quatre ans après la découverte de la maladie de Chagas et du pathogène responsable, des essais de développement de vaccin furent réalisés par E. Brumpt qui tenta d'inoculer des souches atténuées de *T. cruzi* à des souris. Les résultats obtenus ont montré une immunité partielle, avec une réduction de la mortalité mais également une persistance de la parasitémie¹⁶. Depuis ces premières expériences, il y a eu de nombreuses autres tentatives de développer un vaccin contre la maladie de Chagas en expérimentant de nombreux types de vaccins différents comme les vaccins vivants atténués, les vaccins à ADN, ou des vaccins composés de protéines recombinantes, cela associé avec différentes formulations et

adjuvants. Ces études ont montré des effets encourageants en prévention de l'infection chez la souris avec notamment une réduction de la parasitémie ou encore une augmentation de la survie. De plus, d'autres études ont été réalisées dans un but thérapeutique et non plus seulement préventif chez des souris préalablement infectées¹⁵.

Ces résultats sont encourageants mais restent cependant limités notamment sur la question de leur efficacité au long terme. En effet, il est plus difficile de développer un vaccin immunisant contre un parasite que contre une bactérie ou un virus pour plusieurs raisons. Premièrement, le génome est plus important et compliqué à exploiter, ensuite il est difficile d'identifier un épitope présent tout au long du cycle de la vie du parasite et enfin il existe des variabilités entre les différentes souches d'un même parasite voire parfois également au sein de l'épitope.

Le développement d'un vaccin doit en effet se faire après la découverte d'un épitope adapté. Une molécule candidate parfaite comporterait les caractéristiques suivantes : être très immunogène, avoir une expression à tous les stades et chez toutes les souches du parasite, être essentiel à l'agent étiologique être positionnée à sa surface et enfin ne pas être propice aux mutations^{17,18}.

Un projet de recherche dans lequel mon laboratoire d'accueil a participé a permis l'identification *in silico* d'épitopes de *T. cruzi* pertinents à partir de banques de données. Ainsi, une construction associant 30 épitopes reconnus par les cellules T CD4⁺, T CD8⁺ ou B du système immunitaire humain fut mise au point, et développée sous la forme d'une construction d'acides nucléiques, chaque épitope étant espacé de ses voisins par des séquences liantes¹⁴.

L'objectif du projet de recherche auquel j'ai participé est de développer un vaccin à ARNm à partir de cette séquence qui produit une structure peptidique immunisant contre la maladie de Chagas. Pour répondre à cet objectif, dans les prochaines parties, je vais développer le principe de la vaccination, ainsi que les nouveaux défis associés aux vaccins à acides nucléiques (en particulier ceux à base d'ARNm) tels que leur structure et leur moyen de vectorisation.

2. La vaccination

La vaccination est un moyen de prévention au long terme envers un agent pathogène responsable d'une maladie infectieuse. Le principe est de produire une réaction immunitaire chez un individu en réponse à la présentation d'un pathogène sans induire la pathologie. Un vaccin est une préparation biologique comportant tout ou partie d'un agent pathogène atténué. En mimant la réaction naturelle du système immunitaire d'un individu à l'antigène présenté, une mémoire immunitaire va être créée permettant une neutralisation plus rapide et plus efficace lors de la prochaine rencontre de l'organisme avec l'agent pathogène¹⁹.

L'impact de la vaccination est comparable à la découverte de l'eau potable en termes de croissance démographique et réduction de la mortalité¹⁹. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), estime que la vaccination permet d'éviter le décès de 2,5 millions d'enfants chaque année dans le monde²⁰. En effet, depuis maintenant plus de deux cents ans, la vaccination a permis l'éradication de la variole ainsi que le contrôle de nombreuses épidémies comme la poliomyélite, la diphtérie ou encore la coqueluche²¹.

2.1. Histoire de la vaccination

Les premières découvertes concernant la vaccination reposent sur des observations empiriques. Les savants avaient en effet remarqué que certaines infections ne se contractaient pas une seconde fois, ou du moins pas de façon mortelle²¹. La légende du roi Mithridate, ayant donné son nom au phénomène appelé mithridatisation, témoigne de cette capacité du corps humain à s'accoutumer au poison après ingestion de petites quantités au long terme²¹. De même, au VII^{ème} siècle, des bouddhistes indiens consommaient du venin de serpent afin de tenter de se protéger contre l'effet des morsures dudit animal¹⁹.

Le principe de « variolisation » fut pratiqué à partir du XI^{ème} siècle en Chine avec l'inoculation de pus ou de squames de patients broyés en sous-cutané ou dans les narines d'un sujet sain^{19,21}. L'observation d'une immunité croisée entre la variole (qui est une maladie humaine) et la vaccine (qui est l'équivalent de la variole chez la vache)²¹ a permis d'émettre l'idée que la vaccine pourrait jouer le rôle d'une variole atténuée dans un but de protection contre cette dernière¹⁹. En 1796, Jenner inocule à un enfant du pus de vache atteinte de la

forme bovine, puis, un mois après, il lui injecte du pus humain infecté par la variole humaine afin de vérifier cette immunisation²¹. Le succès de la vaccination se répand dans l'armée Française à partir de 1871. En effet, la variole tue de nombreux hommes jusqu'en 1902, lorsqu'une loi rendant la vaccination obligatoire a permis de faire disparaître cette pathologie, d'abord du monde occidental, puis du monde entier en 1977²¹.

A la fin du XIX^{ème} siècle, de nombreuses découvertes virent le jour, en microbiologie, comme la description des microorganismes ou l'isolement de pathogènes, ainsi qu'en immunologie avec la compréhension de la formation du complexe anticorps-antigène, ce qui a permis à la discipline de la vaccination de se développer rapidement¹⁹. Cette évolution est en grande partie due aux travaux de Pasteur qui ont permis la description des grands principes de la vaccination et le développement de vaccins vivants atténués chez l'animal (virus du choléra du poulet et contre le charbon du mouton) menant à la vaccination antirabique avec le premier traitement post-exposition le 4 juillet 1885^{19,21}. A la fin du XIX^{ème} siècle, cinq vaccins étaient disponibles : deux vaccins ciblant des pathologies causées par des virus (rage et variole) et trois vaccins ciblant des pathologies causées par des bactéries (typhoïde, choléra et peste)²¹.

Durant le XX^{ème} siècle, de nombreuses découvertes en immunologie comme la distinction entre la protection conférée par les anticorps et celle médiée par les lymphocytes ou encore en microbiologie avec la sélection de mutants atténués par passages en culture cellulaire ont permis l'avancée des connaissances dans le domaine de la vaccination²². En 1908, Albert Calmette et Camille Guérin développent une nouvelle souche de bacille tuberculeux appelée Bacille de Calmette et Guérin ou encore BCG. Après de nombreux passages successifs, cette souche présentait une atténuation de virulence sans perdre ses propriétés antigéniques ce qui conférait une résistance contre l'infection, sans pouvoir redevenir virulente, permettant le développement d'un vaccin antituberculeux²¹.

De nombreux vaccins virent le jour après la seconde guerre mondiale, tels que les vaccins contre la poliomyélite en 1954, la rougeole en 1960, la rubéole en 1962, les oreillons en 1966, la varicelle en 1973, les méningites à méningocoques A et C entre 1968 et 1971, pneumocoque en 1978, hépatite B en 1976 et de nombreux autres encore²¹.

2.2. Les différents types de vaccins

Comme décrit ci-dessus, les recherches concernant les vaccins ont évoluées avec l'avancée des connaissances en microbiologie et immunologie. Le principe est resté le même en reposant sur l'exposition à un produit mimant le pathogène dans le but de stimuler la réaction immunitaire, mais le type d'inactivation du pathogène a évolué. En découlent les deux grandes classes permettant de différencier les vaccins : les vaccins vivants atténués et les vaccins tués ou inactivés.

Les vaccins vivants sont composés de l'agent infectieux affaibli et ils induisent une forme atténuée de la pathologie. Leur immunogénicité est importante mais ils engendrent un risque de développer une maladie vaccinale notamment chez les personnes immunodéprimées, chez qui ils sont contre-indiqués. Ils peuvent être produits en utilisant un pathogène voisin de l'agent infectieux humain (utilisation de la vaccine pour prévenir la variole), en atténuant le pathogène par des passages sur milieu de culture (BCG par exemple) ou par réassortiments génétiques (influenza ou rotavirus)^{19,23}.

Les vaccins inactivés quant à eux, ne possèdent pas de pouvoir infectieux et ne sont donc pas à risque d'engendrer une maladie vaccinale chez les personnes immunodéprimées. Cependant, ils nécessitent des adjuvants et des rappels afin d'induire une protection immunitaire suffisante. Il existe deux sous-groupes dans cette catégorie : les vaccins à germes entiers et les vaccins sous-unitaires. Les vaccins à germes entiers comme les vaccins contre l'hépatite A ou la poliomyélite, sont composés de pathogènes ayant été inactivés chimiquement ou thermiquement. Ils présentent une forte immunité sans risquer de provoquer la pathologie. Cependant, ils présentent aussi certains risques liés à l'induction d'une forte réaction inflammatoire. Les vaccins sous unitaires se présentent sous la forme de fractions antigéniques induisant des anticorps nécessaires à l'immunité vaccinale. Il peut s'agir de fractions de l'agent pathogène comme des anatoxines (pour le tétanos par exemple), des protéines (pour la coqueluche par exemple), des polyosides de la capsule ou de l'enveloppe (pour le pneumocoque par exemple) ou de protéines issues par recombinaison génétique (pour l'hépatite B par exemple)^{19,22,23}.

Les différents types de vaccins sont classés dans le tableau ci-dessous dans lequel des exemples de maladies traitées par ces vaccins sont décrits.

Type de vaccins	Maladies prévenues par des vaccins mis sur le marché	Premier vaccin sur le marché
Vivants atténués	Rougeole, oreillons, rubéole, fièvre jaune, grippe, poliomyélite (voie orale), typhoïde, encéphalite japonaise, rotavirus, tuberculose, varicelle/zona.	1798 (Variole)
Inactivés entiers	Coqueluche (Vaccin entier), poliomyélite (injectable), grippe, encéphalite japonaise, hépatite A, rage.	1896 (Typhoïde)
Anatoxine	Diphtérie, Tétanos	1923 (Diphtérie)
Sous-unitaires (Protéine purifiée, protéine recombinante, polysaccharide, peptide)	Coqueluche, grippe, hépatite B, méningocoque, pneumocoque, typhoïde, hépatite A.	1970 (Anthrax)
Particules virales	Papillomavirus humain	1986 (Hépatite B)

Tableau 1 : Classification des différents types de vaccins

Ce tableau récapitule les différents types de vaccins actuellement sur le marché, les pathogènes ciblés et l'année de la première autorisation de mise sur le marché. Tableau repris et modifié²⁴.

2.3. Le fonctionnement de la réaction immunitaire aux vaccins

L'immunologie est la science étudiant les mécanismes de défense d'un organisme et permet de mieux comprendre, prévenir et combattre les maladies infectieuses. Le système immunitaire, composé d'un ensemble de molécules, cellules et tissus a pour rôle le maintien de l'intégrité de l'organisme au travers d'une organisation coordonnée et précise appelée la réaction immunitaire.

Lors de l'infection par un pathogène (virus, bactérie, etc..), ce dernier va entrer dans l'organisme, se multiplier et détruire les tissus puis se propager. Les premiers effecteurs du système immunitaire sont des barrières physiques telles que la peau ou le mucus qui permettent d'éviter l'entrée du pathogène dans le corps. Si ces barrières sont dépassées, les deux systèmes de défense de l'organisme vont se mettre en place : l'immunité innée puis l'immunité adaptative.

L'immunité innée est immédiate et basée sur la reconnaissance de motifs présents sur les pathogènes. Les cellules qui la composent ont des fonctions de phagocytose (qui leur permet de détruire les éléments étrangers ou les cellules infectées par des virus) et de présentation de l'antigène (qui leur permet de stimuler l'immunité adaptative). L'immunité adaptative quant à elle, implique des lymphocytes B (LB), responsables de l'immunité humorale par la production d'anticorps, et des lymphocytes T (LT), responsables de l'immunité cellulaire. Par leurs récepteurs (respectivement BCR et TCR), ils sont capables de reconnaître des antigènes natifs pour les LB ou apprêtés et présentés par des cellules présentatrices d'antigène (CPA) pour les LT.

Le but premier de la vaccination est de générer une protection contre un agent infectieux en entraînant l'induction d'anticorps neutralisants persistants afin de réduire les délais de réponse lors d'un deuxième contact avec l'agent pathogène. La mémoire vaccinale repose sur l'induction de plasmocytes à longue durée de vie ce qui contribue à la production rapide d'anticorps spécifiques contre le pathogène.

La notion d'adjuvant regroupe les substances ajoutées dans le but d'aider et d'amplifier la réponse immunitaire au vaccin en stimulant la réponse immunitaire innée. Variables par leur nature ou mécanisme d'action, ils entraînent la maturation des cellules dendritiques et stimulent la phagocytose de l'antigène par les CPA. Cela induit une libération de cytokines et chimiokines au point d'injection stimulant ainsi une réponse inflammatoire ce qui va permettre le recrutement de cellules immunitaires.

Concernant certains pathogènes, il est nécessaire d'induire une réponse immunitaire cellulaire, donc introduire les antigènes au sein de cellules, en particulier des CPA. C'est pourquoi les nouveaux défis de la vaccination se tournent vers des techniques innovantes telles que l'injection d'une séquence d'ADN ou d'acide ribonucléique (ARN) codant un ou plusieurs antigènes. Après l'entrée du matériel génétique, la machinerie cellulaire va transcrire et/ou traduire en protéine la séquence et induire la production d'une protéine immunisante au sein de la cellule²⁵.

3. L'ARN messenger

3.1. La molécule d'ARN

L'ARN est une molécule plus ou moins longue composée d'un assemblage simple brin de ribonucléotides souvent synthétisé à partir d'une matrice d'ADN qui joue de nombreux rôles biologiques au sein de la cellule. Différents types d'ARN ont été décrits, chacun ayant une fonction précise et définie. Le type majoritairement retrouvé dans la cellule est l'ARNr ou ARN ribosomique qui est le constituant des ribosomes, un complexe moléculaire permettant la traduction protéique. Les ARNt ou ARN de transfert jouent aussi un rôle dans la traduction protéique en permettant l'association de l'acide aminé correspondant au codon présenté. D'autres types d'ARN ont été décrits comme les ARN non codants ou les ARN interférents qui ont respectivement un rôle de régulation des processus métaboliques ou qui permettent de contrôler l'expression des gènes en inhibant la production de protéine. Enfin, le dernier type d'ARN ayant un rôle biologique majeur au sein de la cellule est l'ARNm.

3.2. L'ARN messenger

L'ARNm, fut découvert en 1961 et caractérisé comme un intermédiaire entre le noyau et les ribosomes qui permet la transmission d'informations génétiques nécessaires à la production protéique²⁶. L'avancée des connaissances a ensuite mis en évidence l'importance de cette molécule dans la régulation de l'expression des gènes²⁷. En continuant d'étudier ses fonctions, des scientifiques se sont intéressés à l'intérêt thérapeutique pouvant être apporté par l'ARNm. En effet, sa capacité à permettre l'expression de n'importe quelle protéine en fait un candidat thérapeutique d'intérêt dans les domaines de la thérapie génique, de la vaccination ou encore des thérapies anti-cancéreuses²⁷. La première utilisation d'ARNm dans un but thérapeutique a eu lieu en 1990 avec l'injection *in vivo* d'ARNm dans une souris dans le but de produire une protéine d'intérêt²⁸. Trois ans après la première injection d'ARNm codant une nucléoprotéine du virus influenza avec pour objectif d'induire une réponse immunitaire a eu lieu²⁹.

3.3. Structure de l'ARNm endogène

L'ARNm eucaryote possède une structure nucléotidique simple-brin avec des éléments définis, décrite en figure 2. De l'extrémité 5' à l'extrémité 3' on retrouve dans l'ordre, une coiffe, une région non traduite en 5' (5'UTR), un cadre de lecture ouvert (ORF) codant une protéine, une région non traduite en 3' (3'UTR) puis une queue de poly A.

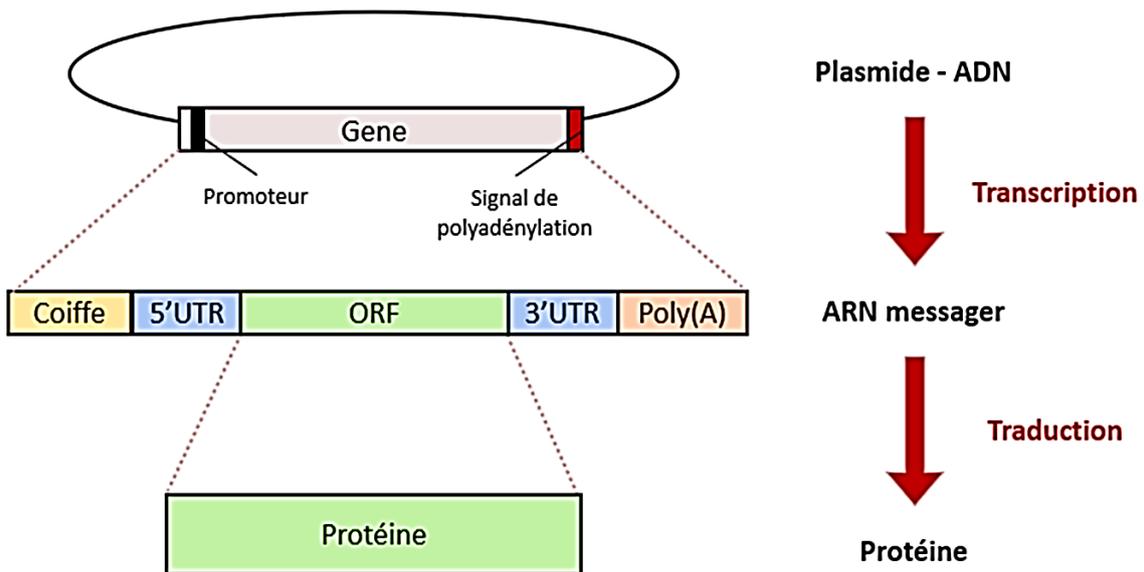


Figure 2 : Structure de l'ARNm et étapes de transcription et de traduction

Ce schéma représente les étapes menant à la production protéique ainsi que les différents éléments nécessaires au fonctionnement d'un ARNm.

La coiffe se compose d'un résidu 7-méthyl-guanosine (m^7G) situé en 5' de l'ARNm naturel et joue un rôle important dans l'export de l'ARNm dans le cytoplasme, la maturation, l'épissage, et l'initiation de la traduction en se liant au facteur d'initiation eIF4E^{30,31}. Elle participe également à la stabilité de l'ARNm en ayant une action sur la dégradation 5'-3'³². Les régions non traduites (5' et 3' UTR) permettent d'améliorer la stabilité et la traduction en empêchant la dégradation de l'ARNm²⁷. Le cadre de lecture ouvert commence par le codon d'initiation AUG, se termine par un codon stop et contient l'information génétique permettant la production de la protéine. La queue de poly(A) est une chaîne de résidus adénosine en 3' de l'ARNm. Elle est importante par sa présence et sa taille pour la stabilité et l'efficacité de la traduction de l'ARNm³³.

3.4. Fonctionnement de la traduction protéique

La traduction protéique s'opère à partir de l'ARNm au niveau des ribosomes, organites constitués de protéines et d'ARNr composés de deux sous-unités. Un des acteurs principaux de la traduction sont les ARNt qui se composent d'une molécule d'ARN comportant un anticodon lié à l'acide aminé spécifique de ce codon.

La première phase, dite « d'initiation » correspond à la phase de reconnaissance du codon initiateur AUG de l'ARNm par la petite sous-unité du ribosome ainsi que la liaison du codon initiateur avec l'ARNt initiateur apportant l'acide aminé méthionine. Lors de la deuxième phase, appelée phase « d'élongation », le ribosome se déplace le long de la molécule d'ARNm de 3 en 3 nucléotides tout en libérant de l'espace pour que l'ARNt puisse se lier à l'ARNm et apporter l'acide aminé correspondant qui va être ajouté à la suite de la séquence protéique par la grosse sous-unité du ribosome. Enfin, la phase « d'arrêt » ou de « terminaison » arrive lors de la présence d'un codon stop (UAG, UGA ou UAA), en absence d'ARNt correspondant il y a un arrêt de la traduction ainsi que la libération de la protéine nouvellement produite. Cette protéine va ensuite subir différentes étapes de maturation pour aboutir à sa structure finale.

3.5. Synthèse d'ARNm synthétique ou exogène :

Il est possible d'obtenir une molécule d'ARNm synthétique fonctionnelle par transcription *in vitro*, à partir d'un plasmide composé de tous les éléments nécessaires présentés ci-dessus (Coiffe, UTR, Cadre de lecture, Queue de poly(A)). Ce principe utilise des éléments du système des bactériophages (tels que T3, T7 ou SP6), de ce fait il est nécessaire d'ajouter dans le plasmide un promoteur bactérien spécifique en amont de la séquence à transcrire. En présence d'une ARN polymérase, de ribonucléosides triphosphates (rNTP) et du plasmide, vont se former des molécules d'ARN d'une taille pouvant varier entre 30 et 10000 nucléotides^{34,35}.

Après la synthèse, le produit obtenu est composé d'un grand nombre de contaminants (nucléotides seuls, transcrits plus courts, plus longs ou ne correspondant pas à la séquence désirée, protéines...) c'est pourquoi le processus de purification joue un rôle très important dans l'obtention du produit souhaité. Certains contaminants peuvent être éliminés par des

étapes de précipitation et d'extraction. En revanche pour être utilisé dans un but thérapeutique, et respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication, il est nécessaire d'éliminer ces transcrits non attendus, notamment par chromatographie en séparant les molécules par taille^{36,37}. De plus, il a été montré que purifier l'ARNm avec la technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC) résulte en l'obtention d'ARNm permettant une production protéique 10 à 1000 fois plus importante, tout en évitant d'activer le système immunitaire avec les débris comme l'ARN double brin, ce qui pourrait entraîner la dégradation précoce de l'ARNm avant la synthèse de la protéine³⁸. La stimulation du système immunitaire par l'ARNm ainsi que la capacité d'auto-adjuvant de ces molécules sont décrites un peu plus loin.

4. Vaccins à acides nucléiques

4.1. Les vaccins à ADN

Par définition, un vaccin à ADN est un plasmide (ADN circulaire extra-chromosomique présent chez la bactérie) qui contient un gène codant une protéine antigénique ainsi qu'un promoteur eucaryote fort permettant l'expression dans la cellule. Le principe est d'utiliser la machinerie cellulaire pour produire la protéine correspondant à la séquence insérée dans le plasmide. Le peptide sera ensuite reconnu par le système immunitaire et permettra une réponse plus efficace et plus rapide lors d'une prochaine rencontre avec le pathogène. Cette technologie est très prometteuse car elle permet de stimuler les différents types d'immunité comme présenté dans la figure 6³⁹, est facile et sans danger à produire, et peut être utilisée à grande échelle³⁹. Les vaccins à ADN ont été étudiés depuis une trentaine d'années et testés dans de nombreuses pathologies infectieuses ou cancéreuses mais leur succès est limité pour le moment, à cause d'une faible efficacité de transfection, d'une faible immunogénicité et en l'absence de résultats concluants chez l'animal^{17,40}.

4.2. Les vaccins à ARNm

Historiquement, les chercheurs ont longtemps préféré l'utilisation d'ADN (car un plasmide est plus stable et moins immunogène qu'une molécule d'ARNm), c'est pourquoi de nombreux obstacles se sont opposés et ont ralenti le développement de l'ARNm dans un but thérapeutique malgré ses atouts^{27,41}. Durant la dernière décennie, les avancées dans la recherche, avec notamment les améliorations possibles de la molécule l'ARNm présentées plus bas, ont ouvert la voie à des innovations majeures et de l'investissement dans l'exploration et l'utilisation de cette technologie.

L'ARNm, pour exercer son activité, n'a pas besoin de traverser l'enveloppe nucléaire (contrairement à l'utilisation de plasmides) car il est pris en charge dans le cytoplasme, ce qui facilite l'administration. De plus, l'ARNm a un profil de sécurité plus fiable que l'utilisation d'ADN car il n'y a pas d'interaction avec le génome hôte et la molécule est dégradée en quelques jours ce qui réduit le risque oncogénique lié à l'intégration dans l'ADN hôte^{17,36,42}.

Les molécules d'ARNm administrées sont dégradées en quelques jours par des mécanismes cellulaires naturels ce qui réduit les risques de toxicité liée aux métabolites résiduels⁴³.

Au niveau de la production d'ARNm, les processus de fabrication dont la transcription *in vitro* sont génériques et essentiellement enzymatiques ce qui est un atout en comparaison avec la production de plasmides qui nécessite de travailler avec des bactéries compétentes ce qui risque de poser des problèmes liés à la contamination avec ces composés bactériens^{44,45}.

Du fait de la présence d'exonucléases ubiquitaires, l'ARNm est beaucoup plus instable que l'utilisation de plasmides ce qui a longtemps été un désavantage majeur, cependant l'avancée des découvertes concernant la formulation ainsi que la conservation sont devenues des points clés devant être pris en considération dans le développement de thérapies à base d'ARNm.

Enfin, l'utilisation d'ARNm peut s'effectuer à la fois dans des cellules qui se divisent ou non car son action s'effectue dans le cytoplasme et n'est pas dépendante du cycle cellulaire.⁴⁵

4.2.1. Modifications de la molécule d'ARNm synthétique

L'administration d'ARNm dans un but thérapeutique peut permettre le remplacement d'une protéine défectueuse, d'apporter une protéine manquante ou encore de produire une protéine immunisant contre un pathogène dans un but de vaccination. Cependant, cette technologie fait face à de nombreux défis, majoritairement car l'ARNm possède une demi-vie courte liée à la présence ubiquitaire d'exonucléases mais aussi car c'est une molécule très immunogène qui risque d'être détruite par le système immunitaire avant même d'avoir pu être traduite en protéine.

Selon l'intention souhaitée, des modifications peuvent être apportées de manière enzymatique lors de la synthèse *in vitro* pour améliorer la molécule et allonger sa durée de vie dans le cytoplasme, éviter de stimuler le système immunitaire ou encore favoriser son recrutement par les ribosomes. L'ensemble des modifications développées permettent d'améliorer la résistance aux exonucléases, de diminuer la répression de la traduction liée à la stimulation du système immunitaire, d'avoir de meilleurs taux d'initiation, et enfin d'obtenir une production protéique beaucoup plus efficace et importante³².

La figure suivante (Figure 3) schématise les différents types de modifications pouvant être effectuées pour améliorer la production protéique après administration d'ARNm exogène.

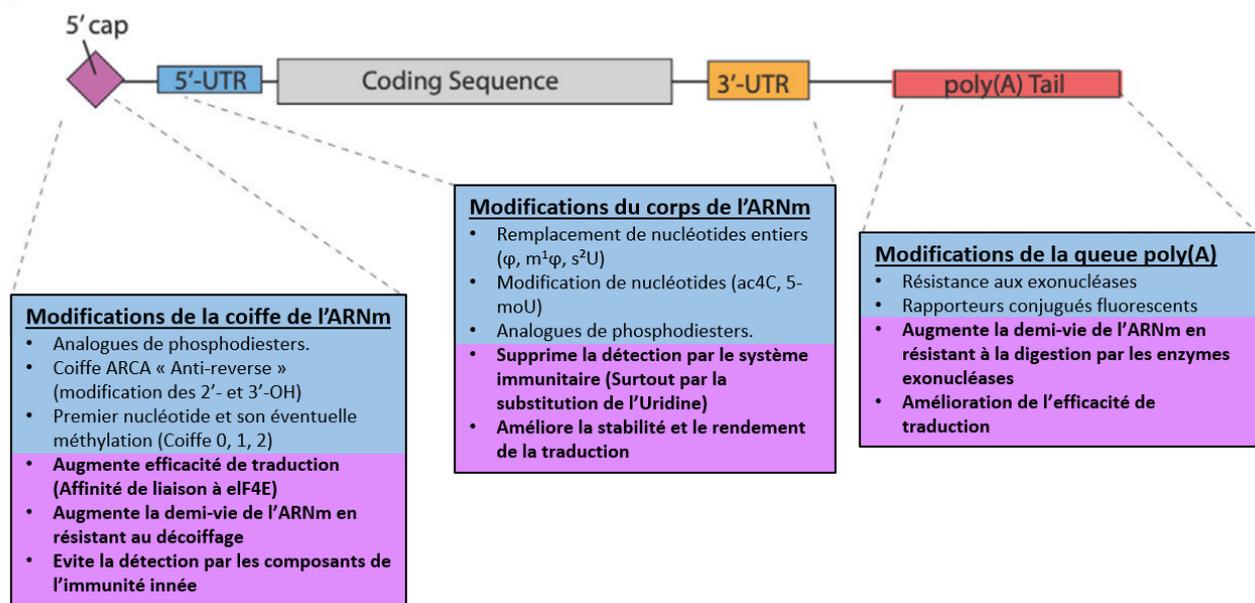


Figure 3 : Modifications de l'ARNm pour une application thérapeutique

Ce schéma présente les différentes modifications pouvant être réalisées sur l'ARNm afin de favoriser la traduction protéique et/ou de potentialiser l'échappement au système immunitaire, en vue de son utilisation dans un but thérapeutique³². Ces modifications sont catégorisées selon leur localisation : la coiffe, les UTRs, la séquence codante, ou la queue. Schéma modifié et traduit³².

4.2.1.1. Coiffe

Pour d'obtenir un meilleur rendement de la protéine d'intérêt il a été important de développer des coiffes améliorées afin d'optimiser la stabilité de l'ARNm et d'améliorer l'étape d'initiation de la traduction^{30,46}. Pour ce faire, plusieurs analogues à la coiffe en 5' ont été développés comme présenté en Figure 4 et peuvent être incorporés durant le processus de transcription *in vitro*. La coiffe classique Cap0 correspond à un enchainement M^7G -ppp-N1-p-N2. La coiffe Cap1 a un ajout d'un groupement méthyle en 2' sur le premier nucléotide après le M^7G (M^7G -ppp-N1m-p-N2) et enfin dans la coiffe Cap2 les deux premiers nucléotides sont méthylés (M^7G -ppp-N1m-p-N2m)⁴⁷. Ces deux coiffes sont retrouvées dans l'ARNm endogène eucaryote et jouent un rôle de signature moléculaire qui permet au système immunitaire de

discriminer l'ARNm du soi et du non-soi⁴⁸. En effet, l'ARNm exogène stimule le système immunitaire car il ressemble à l'infection par des virus à ARN. Utiliser les Coiffes Cap1 ou Cap2 permettrait donc d'obtenir des ARNm moins immunostimulants. Une autre coiffe utilisée est la coiffe ARCA (pour Anti-Reverse-Cap-Analogue). Elle correspond à la coiffe Cap0 sur laquelle un groupement méthyle est ajouté en 3' du ribose du m7G. Cette coiffe permet d'éviter une insertion dans le mauvais sens lors de la synthèse et démontre d'une meilleure efficacité de traduction²⁷. Enfin pour échapper aux enzymes de décoiffage il est possible d'utiliser des ARNm chimiquement modifiés comportant un phosphorothioate^{49,50}, un phosphorothiolate⁵⁰, un imidiphosphate⁵¹, ou encore un boranophosphate⁵² par exemple.

Dans le cadre de ce projet, les ARNm synthétiques commerciaux utilisés portent différentes coiffes afin de comparer leur différence d'efficacité. Comme décrit dans la partie expérimentale, les ARNm utilisés se composent de coiffe ARCA, Cap0 ou Cap1.

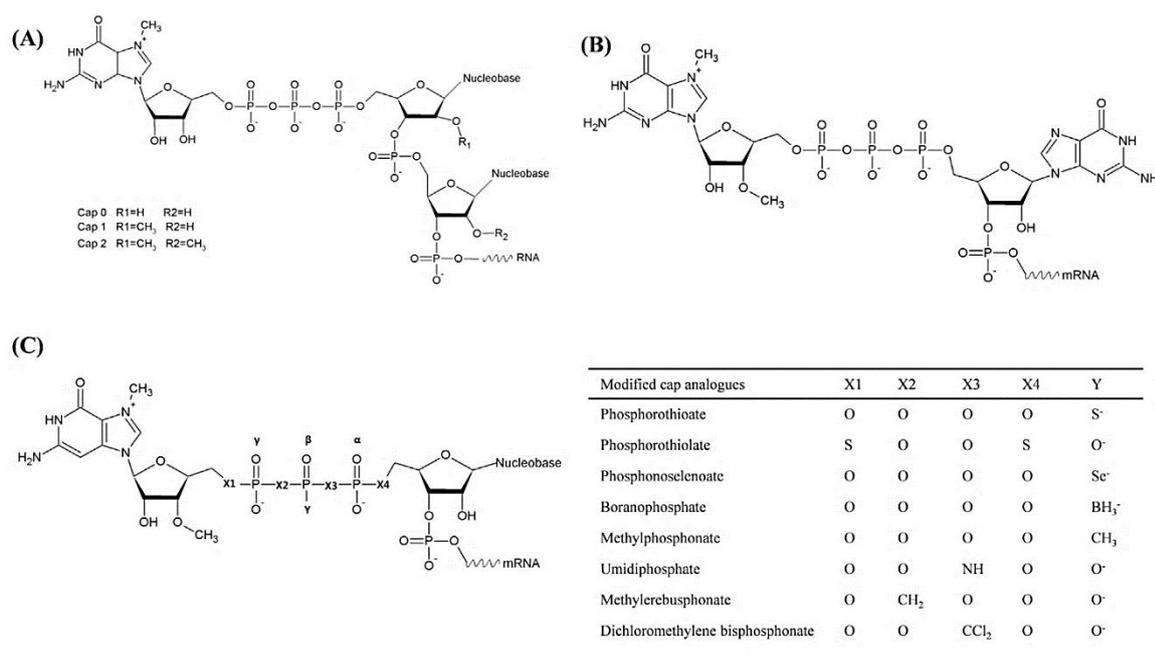


Figure 4 : Structure de coiffes modifiées d'ARNm

Représentation de la structure des coiffes cap0, cap1, et cap-2 (A), de la coiffe ARCA (B), et des autres analogues de coiffe modifiés (C). Illustration modifiée⁴⁷.

4.2.1.2. UTRs

Les séquences 5' et 3' non traduites (UTRs) contiennent de nombreux éléments régulateurs qui modulent la traduction et jouent un rôle sur la stabilité de l'ARNm. Il a été montré que la demi-vie de l'ARNm pouvait être augmentée de plus de 24 heures en ajoutant des éléments stabilisateurs comme les UTRs de l'ARNm qui code les protéines α - ou β -globine²⁷. Il est aussi possible d'introduire des sites favorisant l'internalisation dans les ribosomes (Internal ribosome entry site ou IRES) pour améliorer la traduction ce qui résulte en un rendement protéique beaucoup plus élevé⁵³.

4.2.1.3. Séquence codante

Des modifications peuvent être effectuées dans la séquence codante afin de favoriser la traduction protéique, notamment en optimisant les codons⁵⁴. En effet, le code génétique se compose de 61 triplets de nucléotides aussi appelés codons qui vont être lus par des ARNt complémentaires dans les ribosomes codant pour 20 acides aminés. Plusieurs codons différents peuvent donc donner le même acide aminés, la dégénérescence du code génétique permettant que des séquences différentes codent la même protéine. La fréquence d'utilisation des codons varie beaucoup selon les organismes et impacte l'expression de protéine exogène codées par un ARNm de synthèse. Il est possible d'utiliser des tables représentant la distribution des codons dans chaque organisme pour favoriser la production protéique, par exemple le codon AGG est utilisé 11,2% du temps pour coder l'acide aminé arginine dans des cellules de mammifère alors qu'il est utilisé que 2,1% du temps chez E. Coli⁵⁵.

En plus de cette optimisation par la fréquence des codons, une autre possibilité est de remplacer les nucléosides par des nucléosides modifiés. La modification la plus utilisée est le remplacement de l'uridine (U) par ϕ (Pseudouridine) qui permet de diminuer l'inhibition de la traduction induite par l'immunité innée. De plus, l'utilisation de pseudouridine méthylée ($m^1\phi$) améliore encore la traduction car cela permet l'augmentation de la densité en ribosomes sur l'ARNm⁵⁶. D'autres modifications de nucléotides permettent d'améliorer la stabilité de l'ARNm comme l'incorporation de 6-méthyladenosine (m^6A) ou encore de 2-thiouridine (s^2U) qui permettent d'éviter l'activation de la voie de signalisation du système immunitaire liée à l'interféron qui active la RNase H^{27,32}.

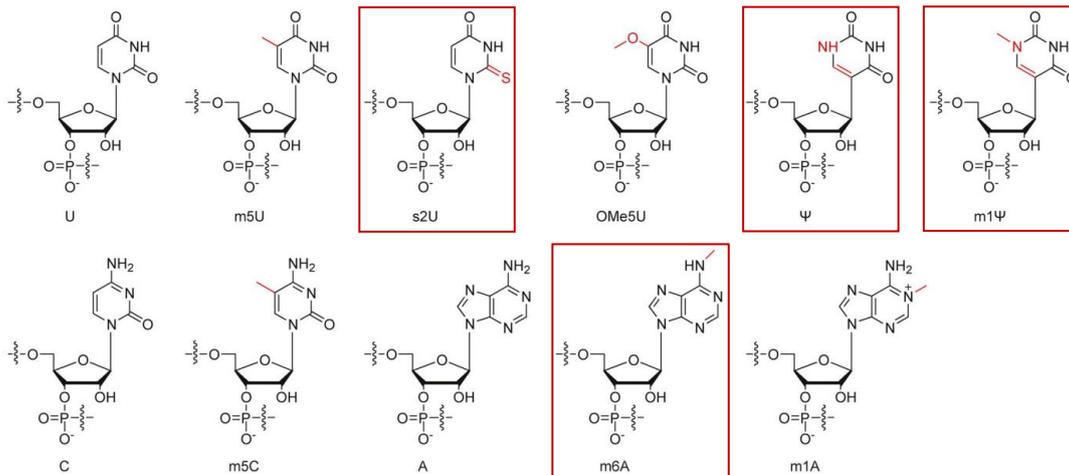


Figure 5 : Structure des nucléotides modifiés

Cette figure présente les différents nucléotides modifiés qui sont utilisés aujourd'hui dans la transcription in vitro d'ARNm²⁷.

4.2.1.4. Queue poly(A)

La queue poly(A) est composée d'une chaîne de résidus adénosine (d'une longueur allant entre plusieurs douzaines jusqu'à 250) qui est présente en 3' de l'ARNm. Cette chaîne permet la formation de complexes ribonucléoprotéiques qui jouent un rôle dans l'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme et qui interagissent dans la traduction protéique et la stabilité de l'ARNm en évitant la dégradation. Cette queue poly(A) subit des dégradations par des mécanismes de déadénylation catalysés par les enzymes suivantes : Pan2-Pan3 lors de la phase d'initialisation et Ccr4-Not lors de la phase finale. Il est possible d'améliorer la stabilité de l'ARNm en empêchant cette déadénylation par l'insertion de modifications dans la queue de Poly(A). Lors des premiers essais, l'idée était d'utiliser des analogues de l'adénosine comme la 8-aza-adénosine ou la désoxyadénosine ou bien d'allonger la queue en ajoutant un maximum de résidus adénosine³². Puis, il a été montré que modifier les liaisons phosphodiester, en remplaçant un phosphate par un phosphorothioate ou boranophosphate par exemple, permet d'empêcher la déadénylation sans compromettre l'expression protéique⁵⁷.

4.3. Immunogénicité de la molécule d'ARNm

Les ARNm exogènes entraînent un effet d'auto-adjuvant car ils présentent des propriétés similaires aux virus à ARN et stimulent de ce fait le système immunitaire. En effet, ils sont reconnus par les CPA ce qui active des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Les ARN à simple brin dont font partie les ARNm stimulent l'activation des cellules dendritiques et leur activité antivirale via la stimulation des PRR tels que TLR7 ou TLR8⁵⁸. Les vaccins d'autres types tels que les sous-unité protéiques ou les peptides ne sont pas activateurs de ces PRR et nécessitent donc souvent l'ajout d'adjuvants, afin d'initier et de soutenir la réponse immunitaire⁵⁸.

Une stimulation excessive de la réponse immunitaire entraîne la sécrétion intense d'IFN de type 1 pouvant entraîner l'inhibition de la traduction de l'ARNm voire entraîner sa dégradation avant d'avoir pu produire la protéine d'intérêt⁵⁸. Il s'agit donc d'un aspect à prendre en compte dans le cas de développement de médicaments à ARNm, selon le type d'activité recherché.

L'ARNm exogène est donc intrinsèquement immunogène par sa capacité à activer l'immunité innée ce qui peut être à la fois un avantage ou un désavantage selon l'application désirée. Dans le cas de la vaccination, cela va lui permettre d'avoir un rôle d'auto-adjuvant, et d'améliorer l'efficacité de la vaccination en stimulant une forte réponse immunitaire, à la fois cellulaire et humorale. De nombreuses techniques ont été développées pour moduler l'immunogénicité afin de conserver cet aspect d'auto-adjuvant tout en réduisant la dégradation précoce liée à la surstimulation du système immunitaire. Par exemple, il est possible de réduire la stimulation du système immunitaire en utilisant des nucléotides modifiés comme vu précédemment ou encore en perfectionnant les étapes de purification après la transcription *in vitro* afin d'éliminer les possibles contaminants tels que l'ARN double brin⁴³.

4.4. Comparaison avec les vaccins conventionnels

En comparaison avec les vaccins dits « conventionnels », les vaccins à acides nucléiques sont une alternative intéressante sur de nombreux aspects. Premièrement, ils sont plus sécuritaires pour les personnels qui les développent ou les produisent car il n’y a pas besoin de manipuler l’agent pathogène pour l’atténuer ou le tuer comme précédemment. Par cela, ils ouvrent la voie et facilitent le développement de vaccins immunisants contre des pathogènes très dangereux, comme le Virus de l’Immunodéficience Humaine (VIH) par exemple, en facilitant les expériences et en réduisant chez le patient, le risque lié à la réactivation du pathogène atténué. Deuxièmement, ces technologies sont moins chères et plus rapides à produire du fait de leurs processus génériques et reproductibles. Cela leur permet donc d’être plus rapidement accessible à un grand nombre de personnes en cas d’épidémie soudaine y compris dans des pays en voie de développement. Troisièmement, l’utilisation d’ADN ou d’ARN est plus intéressant que les vaccins traditionnels car le développement (qui repose sur la séquence d’acide nucléique codant l’antigène d’intérêt) permet d’avoir des outils très spécifiques et maniables. En effet, la séquence peut être modifiée et peut ainsi faire face rapidement à l’arrivée de variants ou de nouveaux pathogènes émergents contrairement aux vaccins traditionnels qui peuvent mettre plusieurs décennies à être développés et qui ne sont pas adaptés aux pathologies à infections chroniques ou répétées (HIV ou HSV par exemple)⁴³.

D’un point de vue immunologique, les vaccins à acide nucléiques permettent d’induire une réponse humorale et cellulaire car la protéine antigénique est produite *in vivo* au sein d’une cellule ce qui n’est pas ou peu retrouvé avec les vaccins traditionnels non-vivants. En effet, après l’entrée du plasmide ou de l’ARNm dans la cellule celui-ci va utiliser la machinerie cellulaire pour produire le peptide d’intérêt qui va ensuite maturer dans le cytoplasme pour être présenté au Complexe Majeur d’Histocompatibilité (CMH) I et entraîner l’activation de lymphocytes T (LT) cytotoxiques. Dans le même temps, la protéine va être sécrétée ou exprimée à la membrane et reconnue par les anticorps activant la réponse humorale et stimulant les lymphocytes B (LB). Enfin, ce principe permet aussi de stimuler les Lymphocytes T helper par la présentation au CMH II qui vont ensuite aller stimuler les réaction des LT et LB⁵⁹.

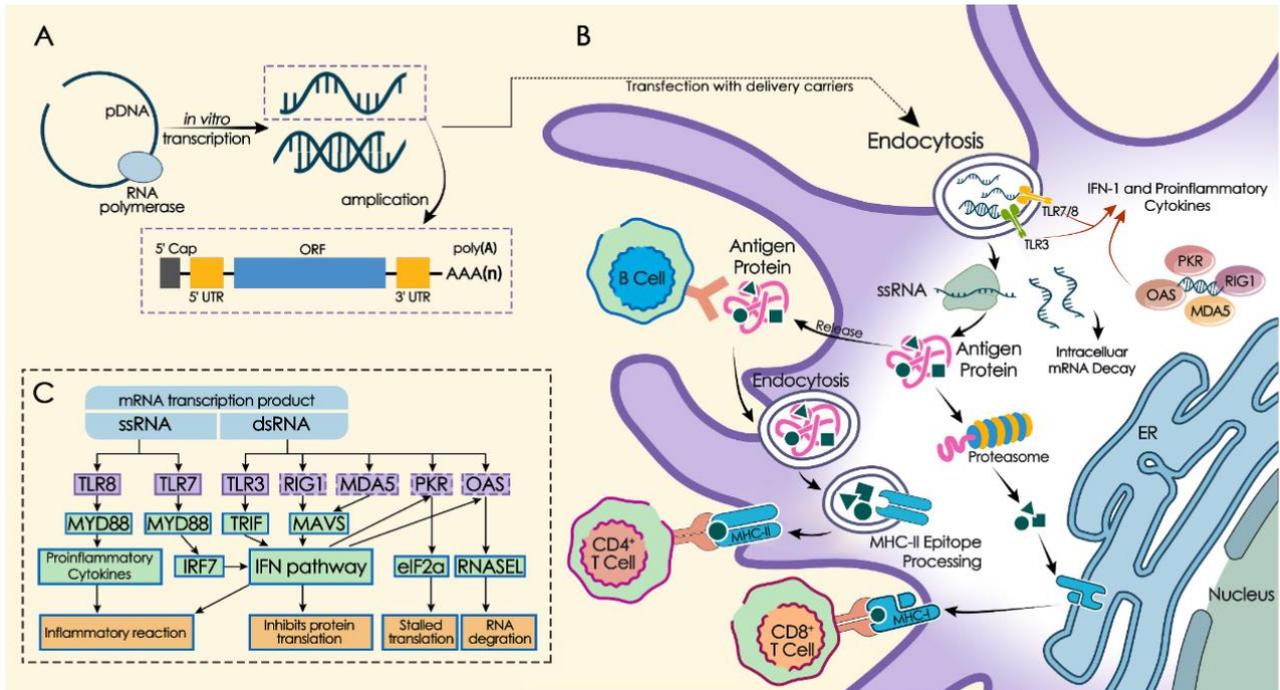


Figure 6 : Schéma représentant l'activation du système immunitaire par un vaccin à ARN.

Ce schéma présente les mécanismes impliqués dans production d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire à la suite d'une vaccination par ARNm⁵⁸.

A) Transcription in-vitro d'ARNm à partir d'un modèle d'ADN circulaire.

B) Traduction de l'ARNm et présentation de l'antigène.

C) Effet auto-adjuvant de l'ARNm exogène et voies de signalisations activées.

5. Vecteurs :

5.1. Le rôle du vecteur

La délivrance d'acides nucléiques dans un but de vaccination fait face à de nombreux défis qui doivent être relevés par la formulation. Les premières expériences d'injection intramusculaire (IM) d'ADN nu ont été réalisées en 1990 chez la souris²⁸. Cette voie d'administration permet d'éviter les obstacles liés à l'administration systémique (clairance rénale, hépatique...). De nombreuses techniques d'administration ont ensuite été développées pour dépasser la barrière cutanée, des techniques physiques (microporation, microaiguilles, jet injection...), actives (électroporation, sonophorèse...) ou passives (Nanoparticules ou liposomes)⁴⁵.

En ce qui concerne l'ARNm, il s'agit d'une molécule de grande taille, chargée négativement, immunostimulante et rapidement dégradée⁴⁵. En effet, l'ARNm nu a une demi-vie plasmatique courte du fait de la présence d'exonucléases et cette instabilité, en dépit des modifications présentées précédemment, impose la présence d'un agent auxiliaire pour l'injection et l'entrée dans le cytoplasme. Des systèmes de vectorisation ont donc été développés pour aider l'ARNm à traverser la membrane plasmique malgré sa taille et sa charge, et ne pas être dégradé par le système immunitaire ou les exonucléases extracellulaires circulantes. Ce vecteur joue donc un rôle de protection en évitant la dégradation précoce mais peut aussi être l'objet de modifications afin de cibler un type cellulaire en particulier et de délivrer l'ARNm spécifiquement. L'avancée des recherches dans le domaine de la vectorisation a permis de faire un immense bond en avant dans le développement de vaccins à acides nucléiques et de thérapies géniques.

Différents groupes de vecteurs ont été étudiés afin de rechercher la formulation la plus adaptée selon l'application désirée et permettre une administration précise de la molécule d'ADN ou d'ARNm⁶⁰. Les systèmes de vectorisation peuvent être classés en deux catégories : les vecteurs viraux ou les vecteurs non-viraux.

5.2. Les vecteurs viraux

Dans la catégorie des vecteurs viraux on retrouve les virus génétiquement modifiés dans lesquels des gènes sont modifiés afin d'y intégrer la séquence d'intérêt et permettre le transfert viral d'ARNm non viral synthétisé in vitro^{45,61}. Pour la première catégorie, les principaux virus utilisés sont les virus à ARN qui se répliquent et expriment leurs protéines y compris la protéine d'intérêt dans le cytoplasme, notamment les suivants : alphavirus⁶², picornavirus⁶³, flavivirus⁶¹. La deuxième catégorie repose sur la protection de l'ARNm synthétique dans le cœur du virus composé de particules rétrovirales et a pour avantage la possibilité de cibler un type cellulaire en modifiant l'enveloppe virale⁶¹.

Ces vecteurs font actuellement face à de nombreux défis devant être relevés pour permettre une formulation d'ARNm sans danger. Premièrement, il existe les risques liés à la manipulation de virus lors de la préparation ainsi que les risques liés à la réaction immunitaire de l'hôte face au virus. Ensuite, les vecteurs viraux sont limités dans la taille de l'insert, réduisant le champ des possibilités pour la séquence codante et la protéine d'intérêt⁶⁴. De plus, selon le virus utilisé il existe un risque d'intégration au génome pouvant causer des mutations oncogéniques⁴⁵. Enfin, le produit final est moins pur comparé à un vecteur non-viral, dû à la présence d'autres ARN d'origine virale⁶¹. Tous ces éléments laissent la porte ouverte à des améliorations permettant de résoudre ces problématiques ainsi qu'au développement de vecteurs indépendants de particules virales.

5.3. Les vecteurs peptidiques

Parmi les technologies non virales, l'utilisation de vecteurs peptidiques est une possibilité pour vectoriser des acides nucléiques même si elle n'est pas fréquemment utilisée pour de l'ARNm. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore spécifiquement élucidé, ces peptides se lient à l'acide nucléique et forment un complexe permettant l'entrée dans la cellule. Ils peuvent entrer dans la cellule en fusionnant avec la membrane plasmique, en favorisant l'endocytose ou encore en interagissant avec des récepteurs situés à la surface cellulaire. Leur conception étant facilement diversifiée par la grande hétérogénéité des acides aminés qui les composent, les vecteurs peptidiques peuvent posséder des caractéristiques physico-chimiques très différentes qui jouent des rôles variables. Par exemple, les peptides

cationiques, riches en acides aminés basiques vont permettre de créer des interactions électrostatiques avec l'acide nucléique alors que des peptides fusogéniques, riches en histidine vont favoriser l'échappement endosomal et le relargage cytoplasmique⁶⁵.

Plusieurs catégories de peptides permettent cette vectorisation, notamment les peptides pénétrant les cellules (CPP), les peptides cationiques, les peptides amphiphiles, les peptides fusogéniques et les peptides comportant un signal d'adressage nucléaire (NLS)⁶⁵.

Pour les CPP, parmi les principaux peptides étudiés, on retrouve le Trans-activating transcriptional activator (Tat) qui a été isolé à partir du VIH et qui s'est montré efficace pour transfecter des plasmides, des oligonucléotides et des protéines⁶⁵⁻⁶⁹. La Pénétratine est un autre peptide qui est utilisé pour la vectorisation d'acides nucléiques. D'une taille de 16 acides aminés ce peptide est dérivé d'une protéine d'un transporteur membranaire^{70,71}. Enfin, un autre CPP est à noter : Arg-Ala-Leu-Ala, il permet de complexer l'ARNm et a été testé pour permettre l'expression d'une protéine antigénique dans un but de vaccination à ARNm⁷¹.

La principale limitation est la difficulté de cibler des cellules spécifiques et la courte demi-vie en circulation car ces vecteurs sont peu stables dans le sérum⁴⁵. Pour remédier à cela ils peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres matériaux⁶⁰. Cependant ces vecteurs sont à l'heure actuelle assez rarement étudiés dans la formulation d'ARNm.

5.4. Les vecteurs polymériques

Un autre type de vecteurs utilisés pour la formulation d'acides nucléiques et principalement d'ARNm sont les vecteurs à base de polymères et principalement les polymères cationiques qui permettent la formation de complexes avec de l'ADN ou de l'ARN, appelés polyplexes. Les polymères sont de grosses molécules composées de l'association de plusieurs plus petites molécules (appelées monomères) pouvant être identiques ou non. A la différence des vecteurs lipidiques, les polymères ne possèdent pas de partie hydrophobe et sont donc solubles dans l'eau. Ces types de vecteurs ne sont pas cliniquement aussi avancés que les vecteurs lipidiques malgré quelques formulations de siRNA. Ils doivent en effet faire face à des défis importants tel que leur dispersion, leur élimination, ou encore la dégradation liée à leur haut poids moléculaire⁷².

Les premiers essais précliniques⁷³ se sont servis du polymère polyéthylèneimine (PEI) représenté en Figure 7, qui est devenu le plus utilisé et étudié pour vectoriser de l'ARNm mais ils ne sont pas parvenus jusqu'aux phases cliniques⁶⁰. En effet, malgré une haute efficacité de transfection, il a aussi été observé une haute toxicité induite par cette formulation. Cette toxicité est liée à la fois aux interactions dans la circulation sanguine entre les protéines sériques et les érythrocytes mais aussi aux interactions du polymère nu dans la cellule après libération des acides nucléiques qui inhibent des processus cellulaires physiologiques et entraînent une contraction de la cellule, une diminution du nombre de mitoses ainsi que la vacuolisation du cytoplasme⁷⁴.

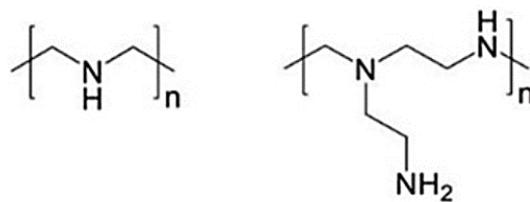


Figure 7 : Représentation du PEI.

Structure linéaire ou ramifiée du polymère PEI⁷⁵.

Pour remédier à cela des modifications ont été explorées afin de réduire la toxicité et favoriser la biodégradation du polymère. Un exemple largement étudié est notamment de greffer des chaînes d'acide gras. Les polymères à base de poly(Glycoamidoamine) auxquels ont été ajoutés des chaînes d'acide gras se sont montrés efficaces pour formuler de l'ARNm portant la séquence codant l'érythropoïétine chez la souris⁷⁶. Ensuite, des polymères dépendants du pH ont été développés et nommés « charge-altering releasable transporters » (CARTs). Ces vecteurs ont la capacité de se réarranger et de libérer l'ADN ou l'ARNm au pH physiologique de 7,4. Cette dégradation biocompatible faciliterait l'échappement endosomal des produits et favorise la production protéique⁷².

Les recherches se poursuivent actuellement pour développer un vecteur polymérique efficace, la voie étant orientée vers des produits biologiquement compatibles pour éviter l'agrégation dans la circulation sanguine et biodégradables afin de réduire la toxicité. En particulier, un autre polymère très étudié est le Poly-L-Lysine représenté en Figure 8, qui est un polypeptide linéaire formé par la répétition de l'acide aminé lysine. Du fait de sa constitution par un acide aminé, il est de nature biodégradable et n'est pas stocké dans le cytoplasme après la libération de l'ADN ou l'ARNm comme peut l'être le PEI⁷⁴.

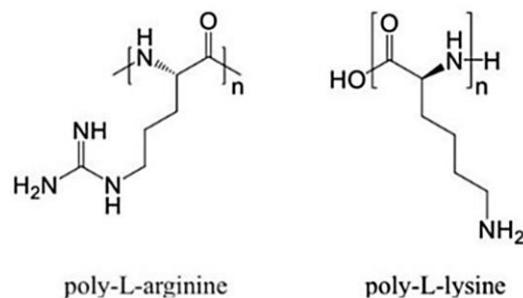


Figure 8 : Représentation de Poly-L-Arginine et Poly-L-Lysine.

Structure de polymères cationiques basés sur la répétition d'acides aminés⁷⁵.

5.5. Les vecteurs lipidiques

5.5.1. Composition des vecteurs lipidiques :

Dans la catégorie des vecteurs non-viraux, les vecteurs lipidiques sont les plus étudiés et utilisés. Ils peuvent être composés de lipides cationiques qui encapsulent l'ARNm ou l'ADN, chargés négativement, à l'aide d'interactions hydrostatiques et électrostatiques⁴⁵. La structure de ces lipides cationiques, schématisée en Figure 9, se compose d'une tête avec un groupe cationique, d'une chaîne liante, ainsi que d'une queue hydrophobe⁷⁷. Différents types de vecteurs lipidiques sont aujourd'hui utilisés et dépendent de la préparation effectuée avec ces lipides cationiques. On retrouve principalement les liposomes, ainsi que les nanoparticules lipidiques et les dérivés conjugués mélangeant différents procédés.

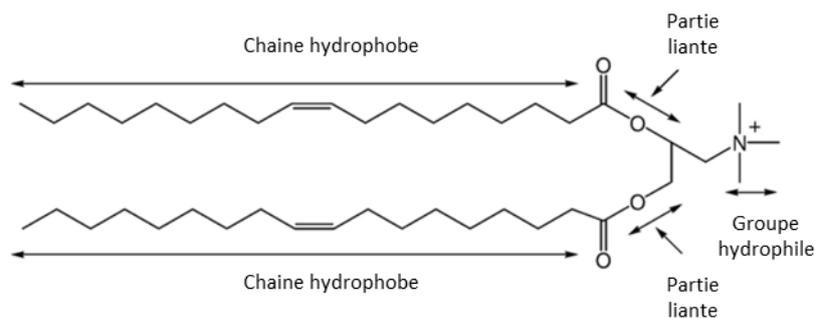
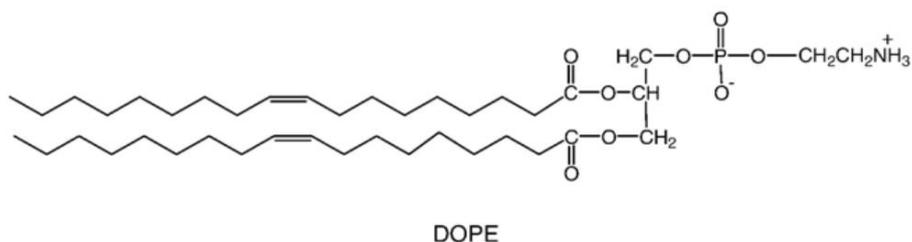


Figure 9 : Représentation structurale d'un lipide cationique.

Exemple du lipide 1,2-dioleoyloxy-3-triméthylammonium propane (DOTAP) comme illustration des différentes parties composant un lipide cationique utilisé pour la préparation de liposomes cationiques. On retrouve une partie hydrophile, une partie faisant le lien ainsi qu'une chaîne hydrophobe. Schéma repris et traduit⁷⁴.

Les lipides cationiques, sont de nature pro-inflammatoire, ce qui représente un effet indésirable majeur pour l'utilisation *in vivo* et en clinique car cela peut entraîner une dégradation précoce. Pour remédier à cela, des lipides neutres comme la DOPE (Figure 10), sont incorporés dans la préparation des différentes formulations, afin d'aider à déstabiliser la membrane des endosomes ainsi qu'à diminuer les charges globales des structures⁶⁴.



DOPE

Figure 10 : Représentation structurale d'un lipide neutre

Exemple du lipide neutre, la dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) qui présente une charge positive et une charge négative⁷⁴.

Enfin, la dernière catégorie de lipides utilisés dans la formulation d'acides nucléiques comporte les lipides ionisables. Ce sont des lipides chargés positivement à pH acide ce qui permet la formation d'un complexe avec l'ARNm dans un milieu acide et qui sont neutres à pH physiologique ce qui permet de réduire la toxicité après injection systémique⁴⁵. Après une preuve de concept démontrée en 2015, les lipides ionisables sont les plus récents et sont généralement les plus utilisés aujourd'hui.

5.5.2. Structures des vecteurs lipidiques :

Historiquement, les liposomes ont été découverts en 1965 et décrits comme une structure sphérique composée d'une bicouche lipidique générée par la dispersion de phospholipides dans un environnement aqueux⁷⁸. Leur structure amphiphile permet aux liposomes de piéger des agents hydrophiles dans leur cœur aqueux et des composés hydrophobes dans leur partie lipidique. Ils permettent ainsi la formulation de nombreux médicaments, anticancéreux, anti-infectieux ou anti-inflammatoire, en permettant une protection contre la dégradation, le ciblage et le relargage précis de ces principes actifs⁷⁹. En effet, dès 1995, le médicament Doxil[®] fut le premier nanomédicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et mis sur le marché. Il est composé de doxorubicine liposomale et a montré un intérêt dans le traitement de nombreux cancers en permettant une circulation prolongée du principe actif ainsi qu'un relargage spécifique au niveau de la tumeur⁸⁰.

Leur structure de bicouche lipidique, semblable à celle des membranes plasmiques présente un avantage majeur en termes de biocompatibilité et permet un ciblage spécifique du principe actif qui entraîne une réduction des effets indésirables. En effet, lors d'une étude comparant la réponse de patients neutropéniques fébriles à l'amphotéricine B liposomale en comparaison avec l'amphotéricine B classique, on observe une diminution du nombre d'infections fongiques, une diminution des effets indésirables liés à l'administration, ainsi qu'une baisse de la néphrotoxicité dans la cohorte traitée avec la formulation liposomale⁸¹. Un autre avantage à l'utilisation de ces liposomes est que la production est facile et reproductible à grande échelle avec une faible variabilité entre les différents lots ce qui est un point clé pour une distribution industrielle^{64,82}.

La classe des liposomes est ainsi intensément étudiée depuis de nombreuses années dans le but de formuler différents principes actifs, c'est donc tout naturellement qu'ils sont devenus des vecteurs de premier choix lorsqu'il a fallu rechercher des formulations pour administrer des acides nucléiques car leurs charges positives permettent de former des complexes avec l'ADN ou l'ARNm. Par définition les lipoplexes sont les complexes formés par le mélange de lipides cationiques avec des acides nucléiques. Ce mélange entraîne une réorganisation de la structure qui permet d'obtenir des particules composées de lamelles lipidiques dans lesquelles s'intercale l'acide nucléique entre ces lamelles.

Cette formulation joue un rôle protecteur de l'ARNm contre les endonucléases et favorise l'entrée dans la cellule, tout en étant compatible avec une circulation sanguine⁶⁴. En effet, l'hémocompatibilité est un aspect majeur pour une application en clinique c'est pourquoi il a été montré une absence d'altération des différents paramètres hématologiques tels que les marqueurs d'activation de la coagulation, des plaquettes, du complément, l'hémoglobine, l'hématocrite, ou encore la numération des érythrocytes ou leucocytes⁶⁴.

Un autre avantage de l'utilisation de liposomes comme vecteurs est la durée de la stabilité des lipoplexes, qui a été mesurée à au minimum 80 jours à 4°C et qui donne de l'espoir pour l'application pratique et la distribution à grande échelle⁶⁴. Les nanovecteurs, et particulièrement les liposomes sont donc depuis de nombreuses années des éléments prometteurs très étudiés afin de développer des améliorations comme la taille, leurs charge, ou encore le ciblage primaire (Organe), secondaire (Type cellulaire) ou tertiaire (Organite)⁸³.

5.6. Les combinaisons de vecteurs

Les liposomes traditionnels utilisés font face à des limites importantes notamment par leur capacité à fusionner entre eux ou à interagir avec des protéines sériques ce qui modifie leur taille, leur efficacité à cibler la cellule d'intérêt et favorise leur élimination par le système immunitaire⁷⁹. Pour remédier à cela, il a été développé de nouvelles formulations de liposomes combinées avec des polymères par des interactions électrostatiques ou covalentes. Ces polymères permettent de stabiliser les lipoplexes renforçant leur structure et en fournissant un encombrement stérique qui évite l'agrégation de protéines sériques ce qui permet d'allonger la durée de circulation in vivo. Ces liposomes modifiés ont donc une stabilité ainsi qu'une demi-vie qui peuvent être prédites et modulées. Le principal polymère utilisé est le Poly Ethylène Glycol (PEG). Déjà présent dans de nombreux produits pharmaceutiques car il permet d'allonger la demi-vie d'un principe actif en y étant conjugué, il est aussi utilisé pour formuler des acides nucléiques⁷⁵.

De plus, il est aussi possible de favoriser le ciblage cellulaire en fusionnant l'enveloppe lipidique avec des ligands (protéines, anticorps, peptides...) afin de permettre la libération de l'acide nucléique dans un type de cellule spécifique et que la protéine d'intérêt soit produite majoritairement au sein d'une cellule adéquate.

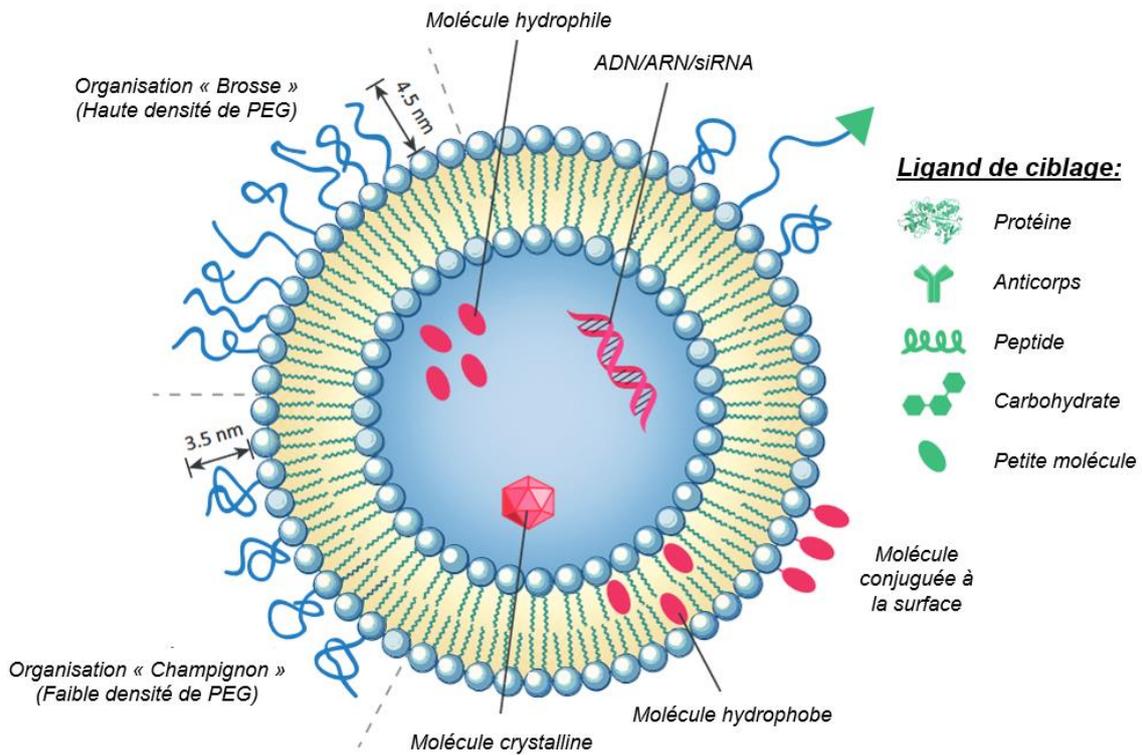


Figure 11 : Différentes optimisations possible dans le développement de liposomes.

Schéma représentant les principales caractéristiques d'un vecteur liposome ainsi que les modifications possibles qui vont permettre le ciblage cellulaire et un allongement de la durée de vie in vivo. Schéma repris et traduit⁸².

5.7. Utilisation en clinique aujourd'hui

Récemment, l'utilisation d'ARNm en clinique a connu un essor rapide et considérable, dû à la pandémie liée au virus SARS-CoV2 et au développement de vaccins. Ces vaccins ont pu être mis sur le marché en quelques mois car la formulation était déjà en cours de développement depuis de nombreuses années et la séquence d'ARNm a pu être déterminée puis modulée au fur et à mesure des découvertes sur le virus comme le séquençage de son génome. Cela démontre l'avantage majeur des nouvelles technologies dans la vaccination, qui est l'adaptabilité rapide et la flexibilité vis à vis des pathogènes émergents et à leurs variants.

A l'heure actuelle, il existe plusieurs catégories de traitements autorisés sur le marché qui ciblent et/ou utilisent l'ARN dans leur mode d'action⁸⁴. La première catégorie concerne les médicaments à base d'ARNm qui permettent d'induire la production d'une protéine d'intérêt fonctionnelle. C'est dans cette catégorie que se retrouvent les vaccins à ARNm et notamment ceux prévenant les complications dues à la Covid-19, le tozinaméran (COMIRNATY®)⁸⁵ ou l'Elasoméran (SPIKEVAX®)⁸⁶ respectivement développés et produits par les laboratoires BioNTech-Pfizer et Moderna. Ils se composent d'un ARNm comportant la séquence codant la protéine Spike et qui permet à la machinerie cellulaire du receveur d'exprimer la protéine et de la présenter à la surface afin d'enclencher une réponse immunitaire. Cette protéine est naturellement présente sur l'enveloppe du virus afin de lui permettre l'entrée dans la cellule hôte en interagissant avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2⁸⁷. En ce qui concerne la formulation du vaccin COMIRNATY® par exemple, l'ARNm est encapsulé dans un cœur lipidique composé de nanoparticules ionisables qui dépendent du pH du fait de cette ionisabilité (ALC-0315, ALC-0159), de phospholipides (1,2-Distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou DSPC), et de cholestérol^{87,88}.

Dans la deuxième catégorie d'ARN thérapeutiques on retrouve les ARN interférents tels que les siRNA ou les miRNA qui sont des petites molécules pouvant se fixer respectivement sur un ARNm spécifique ou en cibler plusieurs. Ils jouent un rôle important dans la régulation car ils permettent de bloquer la traduction et l'expression protéique. Plusieurs médicaments sont actuellement sur le marché tels que le Patisiran (ONPATTRO®) produit par le laboratoire ALNYLAM et qui est indiqué dans le traitement de l'amylose hépatique héréditaire et sa complication la polyneuropathie amyloïde à transthyrétine afin de réduire l'accumulation de transthyrétine. D'autres médicaments composés d'ARN interférents sont produits par ce laboratoire, tels que le Lumasiran (OXLUMO®) dans l'hyperoxalurie primitive de type 1 ou encore le Givosiran (GIVLAARI®) dans le traitement des porphyries hépatiques aiguës.

Enfin, la dernière catégorie de médicaments ayant un mode d'action lié à l'ARNm sont les oligonucléotides antisens qui vont se lier de manière spécifique à l'ARNm et réguler l'expression protéique en masquant ou en révélant des séquences impliquées dans la traduction. On retrouve notamment Nusinersen (SPINRAZA®) qui est indiqué dans le traitement de l'amyotrophie spinale 5q.

Partie expérimentale

1. Objectifs du projet :

L'objectif de ce projet est de générer un vaccin immunisant contre la maladie de Chagas composé d'ARNm et de liposomes cationiques formant des lipoplexes qui sont des structures lamellaires lipidiques dans lesquelles l'ARNm s'intercale. Pour cela, le projet est divisé en deux grands chapitres : premièrement le développement de la formulation et du vecteur, puis celui de l'ARNm comportant une séquence immunisante.

Une séquence peptidique a déjà été décrite *in silico*¹⁴ et est composée d'une association de 30 épitopes spécifiques de *Trypanosoma cruzi* qui entraînent une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Une séquence d'acides nucléiques correspondant à cette protéine a été ainsi développée, cependant, l'injection d'un plasmide comportant cette séquence chez la souris n'a pas permis d'entraîner de réponse immunitaire.

1.1. Formulation d'ARNm

Premièrement, l'idée va être de déterminer le liposome le plus pertinent pour permettre la transfection et la production d'un peptide antigénique. Pour cela, plusieurs liposomes ou dérivés ont été sélectionnés au préalable et vont être testés en transfectant des cellules en culture. Les gènes rapporteurs choisis sont le gène codant la Green Fluorescent Protein (GFP) et la luciférase. Le premier permet, quand il est exprimé de produire une protéine fluorescente témoignant de la bonne traduction de l'ARNm, cette fluorescence pouvant être observée au microscope et quantifiée par cytométrie en flux. La luciférase quant à elle est une protéine ayant été isolée de la luciole qui a la capacité, en présence de son substrat la luciférine, d'émettre de la lumière sous forme de photon pouvant être quantifié. La quantité de luminescence émise est en corrélation avec la quantité de protéine produite, et donc avec l'efficacité de la transfection. De plus, un principe important dans la formulation de complexes de liposomes et d'acide nucléique (aussi appelés lipoplexes) est le rapport de charge. Ce rapport, aussi écrit R_{\pm} , traduit du nombre de charges positives apportées par les lipides

cationiques sur le nombre de charges négatives présentées par l'ADN ou l'ARNm. Déterminer le rapport de charge optimal pour une transfection est un point clé pour favoriser une production protéique la plus efficace possible. Ces deux gènes rapporteurs vont donc permettre de déterminer le ou les liposomes les plus efficaces ainsi que les conditions optimales pour produire les lipoplexes afin de permettre la traduction protéique de l'ARNm. Enfin, ces expériences vont aussi permettre de comparer des ARNm qui se différencient par leurs coiffes ou l'incorporation de nucléotides modifiés.

Dans un deuxième temps, l'idée va être d'adapter ces expériences préalablement effectuées sur cellules afin d'observer la réponse *in vivo* dans un modèle animal. Pour cela, après avoir mis en évidence une ou plusieurs formulations idéales (détermination du liposome, du rapport de charges et choix de l'ARNm), nous allons former des lipoplexes composés de plasmides ou d'ARNm portant la séquence codant la luciférase et les injecter dans le muscle tibial-crânial de souris SWISS. Après un certain temps, les souris seront ensuite injectées avec de la luciférine et la production de luminescence sera observée et quantifiée. Cette expérience va permettre d'analyser la production protéique *in vivo* et d'adapter si besoin la formulation du vecteur.

1.2. Application à la vaccination contre la maladie de Chagas

Un deuxième objectif de ce projet est d'étudier la réponse cellulaire consécutive à la transfection d'un plasmide portant la séquence codant le polypeptide associant les 30 épitopes de *Trypanosoma cruzi*. Le but est de comprendre pourquoi, après injection *in vivo* de ce plasmide, aucune immunité n'a été observée. Une hypothèse étudiée ici est que cette structure protéique, décrite *in silico*, serait éventuellement toxique pour la cellule et serait ainsi dégradée avant d'avoir pu être sécrétée et donc d'induire une réponse immunitaire. Pour explorer cette hypothèse, un test de viabilité cellulaire reposant sur l'utilisation de sel de tétrazolium MTT, va être effectué afin de comparer l'état des cellules après avoir été transfectées par des plasmides codant ce polypeptide. Pour comparer l'éventuelle toxicité nous transfecterons également d'autres plasmides codant des protéines de toxicité connues sécrétée ou non telles que des fragments de toxine botulique par exemple.

2. Matériel et méthode

2.1. Synthèse d'ARNm

Un ARNm portant la séquence codant la luciférase a été synthétisé afin de pouvoir être utilisé pour transfecter des cellules.

La première étape est la conception d'un plasmide pUCmRNA-Luc qui sert de base afin de permettre la transcription en ARNm. Ce plasmide comporte les éléments suivants : *Promoteur T7, 5'UTR de la β -globuline, gène de la luciférase, 3'UTR de la β -globuline, Poly(A), gène de résistance à l'ampicilline*. Il est ensuite linéarisé par digestion par l'enzyme BsaI-HF V2 (New England Biolabs; Référence: R3733S) puis purifié à l'aide du kit PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Référence: 740609.50) selon les indications du fournisseur.

La deuxième étape consiste à effectuer la transcription *in vitro* à l'aide du Kit Invitrogen mMessage T7 Ultrakit selon les indications du fournisseur (Life Technologies ; Référence : AM1345). Brièvement, après décongélation des réactifs nécessaires, le plasmide linéarisé est ajouté à un mix composé de nucléotides tri-phosphates (NTP) et de coiffes, de tampon de réaction, d'un mix d'enzymes et d'eau sans nucléases et incubé à 37°C pendant au moins 30 minutes. Les résidus d'ADN correspondant aux plasmides digérés sont ensuite éliminés par l'ajout du mix d'enzyme Turbo DNase et l'incubation à 37°C pendant 15 minutes. Enfin, l'ARN est précipité à l'aide de chlorure de lithium pendant 30 minutes à -20°C puis centrifugé à 4°C pendant 15 minutes. Après avoir retiré le surnageant, l'ARNm est rincé à l'éthanol 70% puis remis en suspension et la quantité d'ARN est dosée au NanoDrop.

2.2. Préparation de liposomes cationiques

Pour permettre la transfection d'ARNm et d'ADN des différents liposomes sont produits au laboratoire afin d'étudier leur efficacité à introduire l'ARNm ou l'ADN au sein des cellules.

Les liposomes utilisés sont composés du lipide cationique d(2-{3-[bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecylcarbamoylmethyl-acetamide) (DMAPAP⁸⁹) et du lipide neutre DOPE à une concentration de 20 Mm et un rapport molaire 1:1. Pour la préparation d'un liposome, chaque lipide est ajouté dans son ballon respectif avec du chloroforme et agité jusqu'à dissolution complète. Le ballon contenant le lipide DOPE est ensuite transféré dans le ballon contenant le DMAPAP puis un film lipidique se forme à l'aide de l'évaporateur Büchi. Le mélange est ensuite hydraté et laissé à température ambiante toute la nuit. Les liposomes sont ensuite formés à l'aide du Mini-Extrudeur Avanti Polar Lipids en effectuant une vingtaine de passages. La taille des liposomes est ensuite mesurée avec le ZetaSizer puis le lot est validé en effectuant une transfection avec un plasmide exprimant la luciférase et en comparant avec un lot précédemment validé⁹⁰.

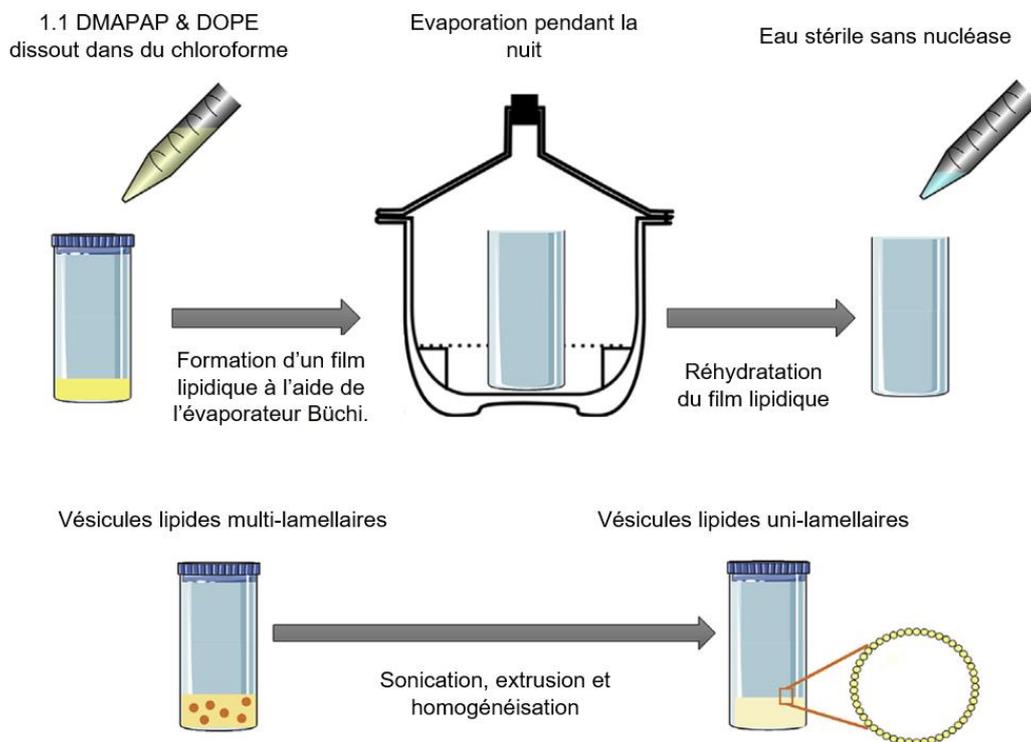


Figure 12 : Représentation schématique de la production de liposomes cationiques.

Schéma représentant les principales étapes de la préparation de liposomes cationiques à partir de lipides cationiques⁶⁴.

Comme vu précédemment, l'ajout de PEG permet de masquer les charges et d'allonger la demi-vie du lipoplexe dans la circulation. Greffer une molécule de cholestérol au liposome permet d'augmenter la stabilité du complexe en augmentant la rigidité. Enfin, la céramide est un sphingolipide : un acide gras lié à un groupement sphingosine via une liaison amide. La céramide est utilisée dans la formation de particules plasmides-lipides stabilisées qui permettent une plus longue demi-vie en circulation et améliorent l'efficacité de transfection⁹¹⁻⁹³.

C'est pourquoi différents liposomes ont été étudiés et des dérivés ont été produits. Les liposomes cationiques peuvent être complétés avec du cholestérol, du polyéthylène glycol (PEG) ou à la céramide aux rapports molaires suivants :

- DMAPAP/DOPE/C14-PEG (1/1/0.06)
- DMAPAP/DOPE/CERAMIDE-PEG (1/1/0.06)
- DMAPAP/DOPE/CHOLESTEROL/CERAMIDE-PEG (1/0.5/0.5/0.06).

Ces lipides (C8 PEG2000 Céramide et C14:0 PEG2000PE) ainsi que le cholestérol sont achetés chez Avanti Polar Lipids et intégrés dans le liposome lors de la préparation comme décrit précédemment par mon équipe d'accueil⁹⁰.

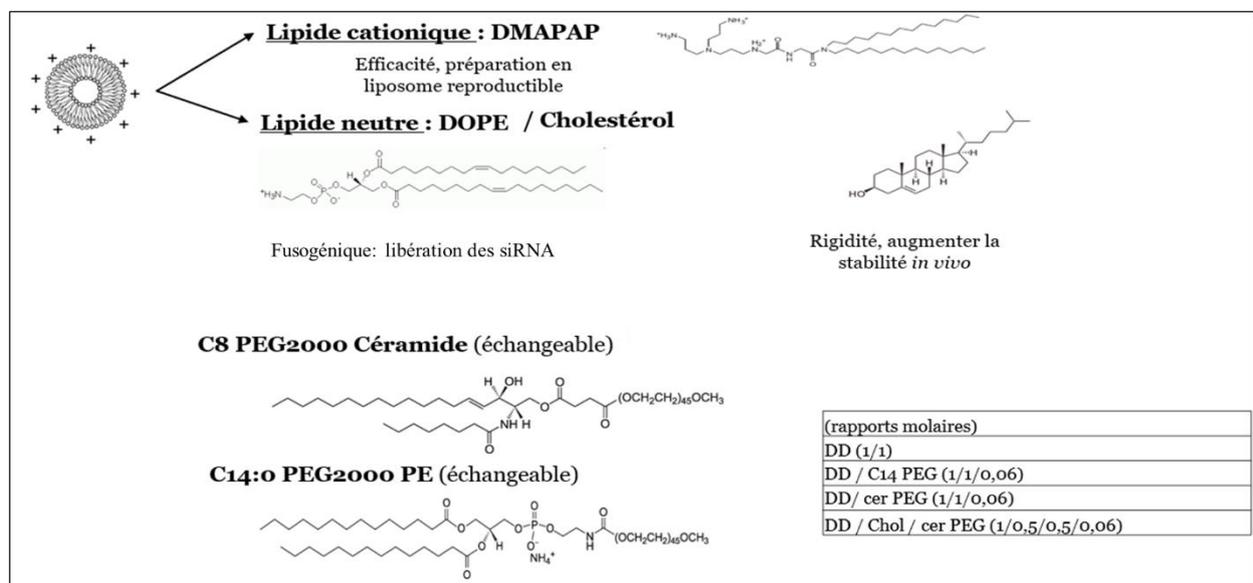


Figure 13 : Lipides utilisés dans ce projet

Illustration représentant les formules chimiques des lipides utilisés pour la préparation des liposomes dans le cadre de ce projet ainsi que les composants ajoutés et leurs rapports molaires.

2.3. Plasmides :

Le plasmide permettant la transcription *in vitro* d'ARNm utilisé dans ce projet est le suivant :

- **pUCmRNA** : Ce plasmide sert de base afin de procéder à la transcription *in vitro* d'ARNm exprimant la luciférase. Il est composé des éléments suivants : Promoteur T7, 5'UTR de la β -globuline, gène de la luciférase, 3'UTR de la β -globuline, Poly(A), gène de résistance à l'ampicilline. La carte du plasmide pUCmRNA est représentée en annexe 1.

Les deux plasmides suivants sont utilisés dans des expériences de transfection *in vitro* pour induire l'expression de différentes protéines détectables et quantifiables *in situ* afin de comparer les différents liposomes ou encore de servir de contrôle positif lors de transfection d'ARNm.

- **pEGFP** : Ce plasmide comporte la séquence du gène codant la Green Fluorescent Protein (GFP). Il est utilisé dans ce projet pour servir de témoin positif de transfection pour comparer l'efficacité de la transfection d'ARNm. La carte du plasmide pEGFP est représentée en annexe 2.
- **pVax Luc** : Ce plasmide est dérivé du plasmide pVax, et a été modifié pour y ajouter le gène codant la luciférase. Ce plasmide pVaxLuc est utilisé dans ce projet pour comparer l'efficacité de transfection des différents liposomes mais aussi pour servir de témoin positif lors de la transfection d'ARNm exprimant la luciférase. La carte du plasmide pVax est représentée en annexe 3.

Les trois plasmides suivants sont des dérivés qui comportent la séquence décrite précédemment qui a été mise en évidence *in silico* pour coder un assemblage protéique de 30 épitopes induisant une réponse immunitaire contre le pathogène responsable de la maladie de Chagas.

- **pVax GFP-Chagas-Myc** : Ce plasmide est dérivé du plasmide pVax et a été modifié pour y ajouter une séquence dite « CHAGAS » qui code un assemblage protéique de 30 épitopes spécifiques de *Trypanosoma*.¹⁴ Ce plasmide comporte également les étiquettes GFP et Myc permettant d'évaluer son efficacité de transfection par cytométrie en flux ou immunohistochimie.

- **pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc** : Il s'agit du plasmide **pVax GFP-Chagas-Myc**, dans lequel la séquence « Chagas » est tronquée en C-term. La séquence codant les deux derniers épitopes est retirée car ces derniers sont très hydrophobes ce qui peut perturber la sécrétion protéique.
- **pVax-Chagas-Myc** : Il s'agit du plasmide **pVax GFP-Chagas-Myc**, dans lequel la séquence codant la GFP est retirée.

Enfin, les deux plasmides suivants sont utilisés afin de répondre à l'hypothèse d'une éventuelle toxicité du peptide produit par la séquence « Chagas ». Ils comportent des séquences de toxine botulique dont le devenir de la protéine produite est connu : secrété ou non.

- **pToxA** : Ce plasmide contient la séquence codant un fragment de la toxine botulique A, dont la protéine produite est secrétée.
- **pToxB** : Ce plasmide contient la séquence codant un fragment de la toxine botulique B, dont la protéine produite n'est pas secrétée.

2.4. ARNm

Différents ARNm sont utilisés dans ce projet afin d'exprimer des gènes rapporteurs produisant des protéines telles que la GFP ou la luciférase. Ils diffèrent par leur type de coiffe ou leurs nucléotides substitués et ces informations sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Comme décrit en introduction, il est possible de modifier la coiffe afin d'améliorer la traduction et d'augmenter la demi-vie de l'ARNm en retardant sa dégradation. Ici les coiffes utilisées sont les coiffes **ARCA** (Avec l'ajout d'un groupement méthyle en 3' du ribose du m7G) qui permet d'éviter l'insertion dans le mauvais sens de l'ARNm dans le ribosome, ainsi que les coiffes **Cap0**, la coiffe classique de l'ARNm endogène ou encore **Cap1** qui correspond à la coiffe Cap0 dont le premier nucléotide est méthylé. Les structures chimiques de ces coiffes sont décrites en introduction.

Un autre point non négligeable dans l'optimisation des ARNm est la substitution des nucléotides. Ici, les ARNm commerciaux utilisés comportent les nucléotides modifiés suivant :

la **pseudouridine** à la place de l'uridine la **5-méthylcytidine** au lieu de la cytidine ou encore la **5-méthoxyuridine** au lieu de l'uridine. Ces modifications permettent d'éviter de stimuler le système immunitaire et de ce fait augmentent la durée d'action de l'ARNm avant sa dégradation.

Nom	Séquence d'intérêt	Substitution de nucléotides	Coiffe	Fournisseur	Référence
FLuc-ARCA	Luciférase	Pseudouridine	ARCA	TriLink	
eGFP-ARCA	GFP	Pseudouridine	ARCA	TriLink	
FLuc-Cap0	Luciférase	Pseudouridine 5-méthylcytidine	Cap0	TEBU	L-6107-100
eGFP-Cap0	GFP	Pseudouridine 5-méthylcytidine	Cap0	TEBU	L-6101-100
FLuc-Cap1	Luciférase	5-méthoxyuridine	Cap1	TEBU	L-7202-100
ARNm Luc	Luciférase		ARCA	Transcription <i>in vitro</i> au laboratoire	

Tableau 2 : Liste des ARNm utilisés dans le cadre de ce projet

Ce tableau présente les différents ARNm utilisés ainsi que leurs caractéristiques (séquence d'intérêt, nucléotides modifiés, coiffe, laboratoire et référence).

2.5. Lipoplexes.

Pour préparer des complexes Liposome-ARNm ou Liposome-ADN aussi appelés lipoplexes, il faut mélanger volume à volume une solution contenant l'ARNm ou l'ADN avec une suspension de liposomes cationiques, dans du NaCl à 150 mM puis vortexer 10 secondes ou une minute pour une transfection d'ARNm ou d'ADN respectivement et enfin laisser reposer 45 minutes à température ambiante avant de procéder à la transfection cellulaire.

2.6. Culture cellulaire

Dans les expériences décrites ci-dessous, les cellules utilisées sont des B16, une lignée cellulaire issue de mélanome de souris, choisie ici pour sa facilité de transfection. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture complet composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) glutaMAX auquel sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un mélange de pénicilline (100U/ml) et de streptomycine (100µg/ml).

2.7. Transfections

Des cellules B16, sontensemencées dans du milieu de culture complet dans des plaques 24 puits à raison de 60 000 cellules par puits puis laissées 24 heures dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, le milieu est retiré puis les lipoplexes (préalablement préparés et dilués dans du milieu de culture complet) sont déposés sur les cellules. Celles-ci sont ensuite laissées dans l'incubateur pendant 24 heures à 37°C et 5% CO₂ avant d'être analysées. La Figure 14 représente schématiquement le principe de la transfection.

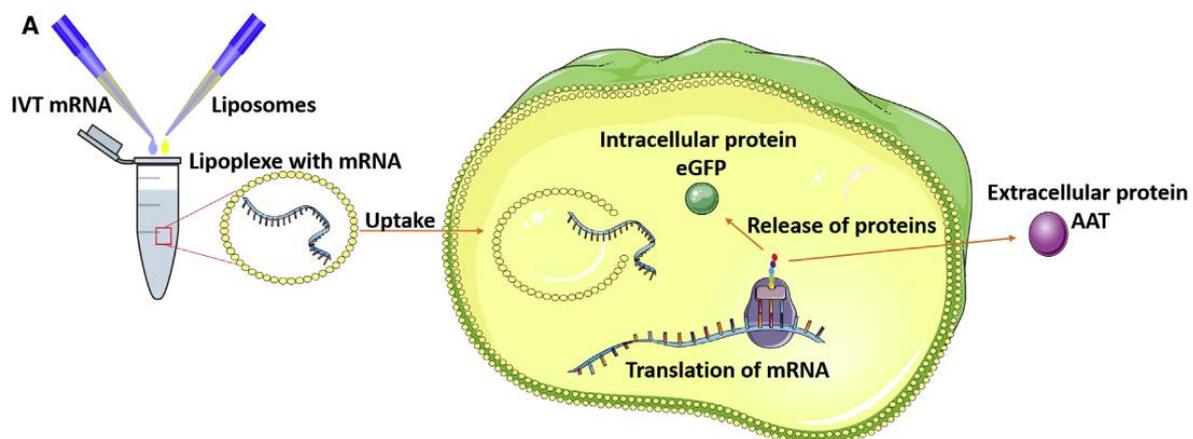


Figure 14 : Représentation schématique de la transfection de lipoplexes.

Ce schéma présente la transfection de lipoplexes composés d'ARNm et de liposomes cationiques dans le but de faire exprimer une protéine d'intérêt dont la séquence codante est présente dans l'ARNm⁶⁴.

2.8. Analyse de l'efficacité de transfection

2.8.1. Quantification de l'expression de luciférase :

Comme vu précédemment, pour quantifier l'efficacité de transfection d'un plasmide ou d'un ARNm permettant l'expression de la luciférase il est nécessaire d'ajouter son substrat, la luciférine. La luciférase produite à la suite de cette transfection va modifier enzymatiquement la luciférine ce qui permet l'émission d'un photon quantifiable.

Tout d'abord, pour lyser les cellules, du tampon de lyse est déposé dans chaque puits (Luciferase cell culture lysis 5X reagent » ; Promega ; Réf. : E1581) et la plaque est laissée 15 minutes à température ambiante. Le contenu du puits est ensuite prélevé et disposé dans des tubes Eppendorf de 1,5mL qui seront centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 tours par minutes.

Concernant le dosage de la luciférase, le surnageant est déposé à raison de 10µl par puits dans une plaque 96 puits blanche. La lecture est ensuite effectuée à l'aide de l'appareil Infinite200 Pro et du logiciel Tecan i-control qui permettent l'injection de 50µl du réactif luciférine (« Luciferase assay system » ; Promega ; Référence : E1501) par puits suivie de la lecture et de la quantification de la luminescence.

Enfin, les protéines totales sont dosées afin de standardiser le résultat de la luminescence sur la quantité de cellules présentes dans le puits et réduire l'impact de la viabilité cellulaire sur les différences de luminescences observées. Pour cela, 10µl du surnageant de cellules lysées et centrifugées sont déposés par puits dans une plaque 96 puits transparente ainsi qu'une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA) à des concentrations allant de 0 à 5mg/ml puis la plaque est placée dans une étuve à 37°C pendant une heure. Le réactif BCA est ajouté selon les instructions du kit « pierce BCA protein assay kit » (ThermoScientifics ; Référence : 23227) puis la plaque est laissée 30 minutes dans une étuve à 37°C. Enfin, la densité optique est lue à 560nm à l'aide de l'appareil Infinite200 Pro et du logiciel Tecan i-control.

2.8.2. Quantification de l'expression de la GFP

Lors de transfection avec un plasmide ou de l'ARNm permettant l'expression de la GFP, l'efficacité de cette transfection est quantifiée par la quantité de cellules exprimant la protéine fluorescente ainsi que la moyenne de l'intensité de fluorescence mesurée dans la population de cellules positives. Pour observer cela, les cellules sont décollées avec de la trypsine et la suspension cellulaire de chaque puits est récupérée dans du milieu de culture complet. 150µl de PBS-SVF (10%) sont ajoutés dans chaque tubes puis homogénéisé. Enfin, après avoir initialisé le cytomètre Guava Easy Cyte 6-2L avec le logiciel InCyte et effectué les réglages de mise au point, les cellules sont passées une à une ce qui permet de récupérer des données comme le pourcentage de cellules exprimant la GFP et le taux d'expression de la GFP.

2.9. Test de viabilité cellulaire

Pour analyser la viabilité cellulaire ainsi que la toxicité induite par la transfection, un test de viabilité au MTT peut être réalisé. Ce test métabolique repose sur l'analyse de l'activité mitochondriale traduisant de la viabilité cellulaire. Cela permet dans ce projet de déterminer la toxicité cellulaire induite par la transfection des plasmides codant la séquence « Chagas ».

48 heures après la transfection de cellules B16 par des plasmides exprimant différents protéines plus ou moins toxiques, dans une plaque 96 puits, 100µl par puits de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) à 0,5mg/ml sont ajoutés. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 5% de CO₂ pendant 3-4 heures jusqu'à l'apparition de précipités violets. Le MTT est ensuite retiré et 100µl de tampon de lyse (constitué de 10% de Triton 100X et 10% de HCl dans de l'isopropanol) sont ajoutés par puits puis les plaques sont laissées sous agitation à température ambiante jusqu'à disparition des cristaux. Enfin, l'absorbance est mesurée à 560nm à l'aide de l'appareil Infinite200 Pro et du logiciel Tecan i-control.

2.10. Transfection *In-Vivo*

Afin d'évaluer l'efficacité des différents liposomes et des ARNm *in vivo*, nous avons effectué des expérimentations chez la souris en injectant des lipoplexes composés d'ARNm codant la luciférase et de liposomes.

Les transfections *in vivo* sont effectuées chez des souris SWISS préalablement anesthésiées avec de la kétamine (100mg/kg) et de la xylazine (10mg/kg). Pour transférer un plasmide permettant l'expression de la luciférase, 15µg de ce dernier sont injectés par voie IM dans le muscle tibial-crânial puis une électroporation de 8 impulsions de 20ms à une fréquence de 5Hz avec un générateur à 180 V/cm est effectuée. Pour transférer de l'ARNm permettant l'expression de la luciférase, des lipoplexes contenant de l'ARNm et des liposomes à un rapport de charge défini sont préparés préalablement puis injectés par voie IM dans le muscle tibial-crânial des souris préalablement anesthésiées.

Pour observer l'efficacité de la transfection, les souris sont de nouveau anesthésiées 24 heures après l'injection puis 500µg de luciférine sont injectés par voie IV. La quantification de la luminescence émise s'effectue à l'aide de l'appareil Bioslabs.

L'utilisation d'animaux pour ce projet a été approuvée par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale et autorisée par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

2.11. Analyse statistique

Les analyses statistiques présentées dans ce projet ont été effectuées en utilisant le logiciel Graphpad Prism. Les résultats obtenus lors des expériences du test de viabilité cellulaire au MTT ont été analysés en utilisant le test d'analyse des variances ANOVA. Un résultat avec $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

3. Résultats

3.1. Synthèse in vitro d'ARNm

Le premier objectif de ce projet est de synthétiser de l'ARNm *in vitro* à l'aide du kit Invitrogen mMessage T7 Ultrakit afin d'effectuer des transfections. Pour cela, le gène candidat codant la luciférase a été sélectionné et le plasmide correspondant a été utilisé (pUCmRNA-Luc). Ce plasmide comporte la séquence d'intérêt ainsi que les régions nécessaires à la formation d'une molécule d'ARNm (UTRs, queue poly(A)...) et à la transcription *in vitro* (Promoteur bactériophage, ici T7). Au départ, 10µg de plasmide ont été utilisés, pour produire de l'ARNm permettant l'expression de la luciférase et cette la transcription *in vitro* a permis de produire au total 430ng d'ARNm ce qui est une quantité très faible en comparaison avec ce qui est attendu et obtenu habituellement. Cet ARNm sera ensuite utilisé lors des expériences de transfection afin de quantifier la protéine luciférase produite en y ajoutant de la luciférine.

3.2. Transfections in vitro

L'idée principale du projet est de rechercher la formulation la plus adaptée permettant l'expression d'une protéine d'intérêt avec l'injection de lipoplexes formés d'ARNm codant cette protéine et de liposomes permettant la distribution de cet ARNm au sein de la cellule. C'est pourquoi le deuxième objectif de ce projet est d'étudier la transfection *in vitro* de ces lipoplexes.

Pour répondre à cette question nous avons dans un premier temps caractérisé le rapport de charge optimal du liposome DMAPAP/DOPE en transfectant un plasmide témoin codant la luciférase. Dans un deuxième temps, lorsque que les conditions optimales d'utilisation du liposome ont été déterminées nous avons transfecté différents ARNm afin d'observer si l'efficacité de leur transfection est corrélée avec leurs changements structuraux (coiffes et/ou nucléotides modifiés). Enfin, nous avons évalué si les liposomes dérivés du DMAPAP/DOPE ont une efficacité de transfection différente liée à leurs modulations (ajout de cholestérol ou de PEG par exemple).

3.2.1. Caractérisation du rapport de charge optimal du liposome DMAPAP/DOPE pour la transfection cellulaire *in vitro*

Le but de cette expérience est dans un premier temps de déterminer le rapport de charge optimal permettant de transfecter des cellules avec le liposome DMAPAP/DOPE. Pour cela nous avons utilisé le plasmide pVaxLuc (qui permet l'expression de la protéine de la luciférase) à la dose fixe de 0,5µg par puits (dans des plaques de 24 puits) et nous avons déterminé ensuite la quantité de protéine produite, via l'émission de photons après ajout de luciférine. Ici, le plasmide est connu pour exprimer correctement la protéine luciférase et est utilisé afin de déterminer le rapport de charges (R_{\pm}) optimal pour une transfection de plasmide avec le liposome DMAPAP/DOPE. Le rapport de charge se définit par le rapport des charges positives (apportées par le lipide) sur les charges négatives (apportées par l'ADN). Dans la figure 15, on peut observer, le taux d'expression de la luciférase quantifié par la quantité de photons en coups par seconde (CPS) émise après 48 heures de transfection puis lyse cellulaire et traitement avec le réactif luciférine.

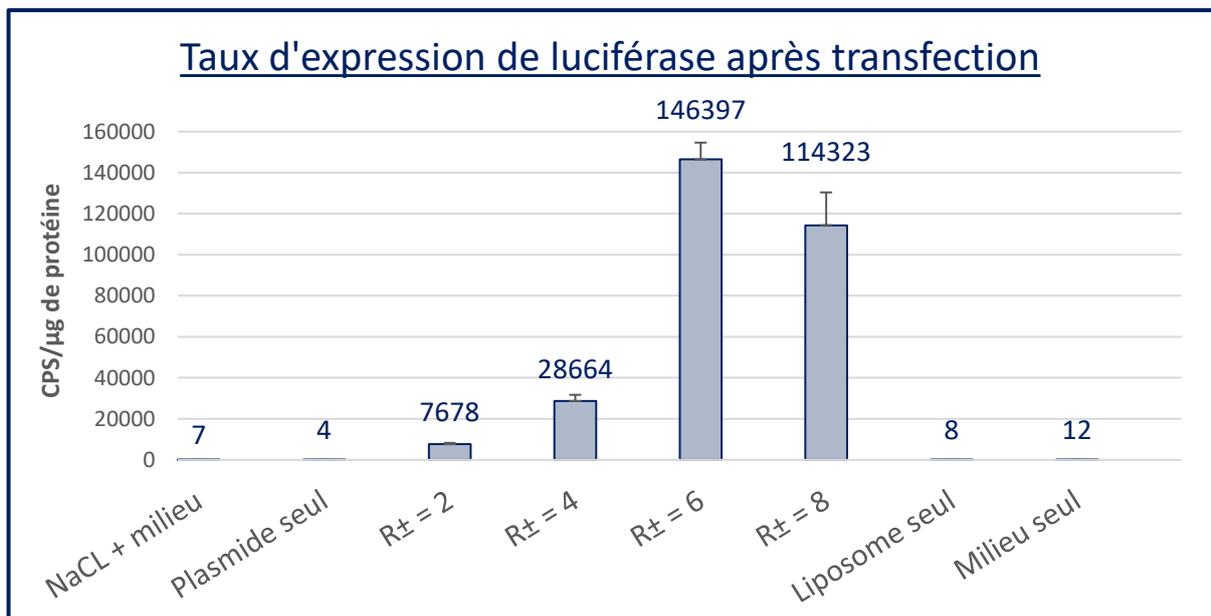


Figure 15 : Activité luciférase en coups par seconde par µg de protéines.

Des cellules B16, préalablementensemencées à 60 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits sont transfectées par des lipoplexes composés de 0,5µg de plasmide pVaxLuc par puits et des liposomes DMAPAP/DOPE en testant différents rapports de charge allant de $R_{\pm} = 2$ à $R_{\pm} = 8$.

Comme il est logiquement attendu, il n'y a pas d'expression de la luciférase dans les conditions de contrôles : NaCl + milieu ; Plasmide seul + NaCl + milieu ; Liposome seul + NaCl + Milieu ; Milieu seul. Ces résultats montrent qu'il est nécessaire de transférer le plasmide avec un vecteur, ici le liposome DMAPAP/DOPE, pour obtenir l'expression de la protéine d'intérêt.

En effet dans les quatre conditions qui contiennent ces deux éléments, il y a une production de luciférase traduite par l'émission de photon. Cependant, le niveau d'expression est très différent selon le rapport de charge : on observe un optimum pour $R_{\pm} = 6$ avec une efficacité de transfection près de 20 fois plus élevée qu'avec le rapport de charge $R_{\pm} = 2$.

3.2.2. Caractérisation de l'efficacité de transfection de différents ARNm avec le liposome DMAPAP/DOPE

Maintenant que la capacité de transfection du liposome DMAPAP/DOPE est déterminée et qu'un résultat optimal est observé à un rapport de charge $R_{\pm} = 6$ en utilisant un plasmide, l'idée est de continuer l'exploration en transfectant de l'ARNm dans les mêmes conditions afin de déterminer une formulation idéale.

Comme vu précédemment, l'ARNm est une molécule instable, propice aux dégradations et dont les conditions de stockage sont importantes pour maintenir son intégrité, notamment dans un milieu exempt d'exonucléases. L'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage travaillant principalement sur le domaine de la vectorisation d'acides nucléiques (Plasmides, ARNm, siRNA...), possède plusieurs lots d'ARNm différents, permettant l'expression de la protéine luciférase ou de la GFP.

Le but de cette expérience pilote est donc de transférer des cellules avec les différents ARNm et de déterminer leur capacité à produire la protéine d'intérêt, telles que la luciférase ou la GFP, et de quantifier cette efficacité respectivement par l'émission de photon après ajout de luciférine ou par cytométrie en flux. Cette expérience permet aussi d'analyser des éventuelles différences liées aux modifications apportées à la structure des ARNm comme la coiffe ou les nucléotides modifiés. Enfin, nous pouvons aussi par cette expérience contrôler la stabilité au long terme de nos ARNm, certains ayant été stockés plusieurs années à -80°C .

3.2.2.1. Etude de l'expression de la GFP par la transfection d'ARNm

Premièrement, différents ARNm comportant la séquence codant la protéine GFP ont été transfectés avec un liposome DMAPAP/DOPE au rapport de charge $R_{\pm} = 6$. Comme vu précédemment, un point important qui influe dans l'efficacité de la production protéique est la coiffe de l'ARNm. Ici, les ARNm utilisés présentaient deux coiffes différentes : ARCA et Cap0. 48 heures après la transfection, les cellules ont été collectées et analysées par cytométrie en flux afin de déterminer le taux de cellules exprimant de la fluorescence verte, traduisant la correcte transfection et l'expression de la GFP (Figure 17).

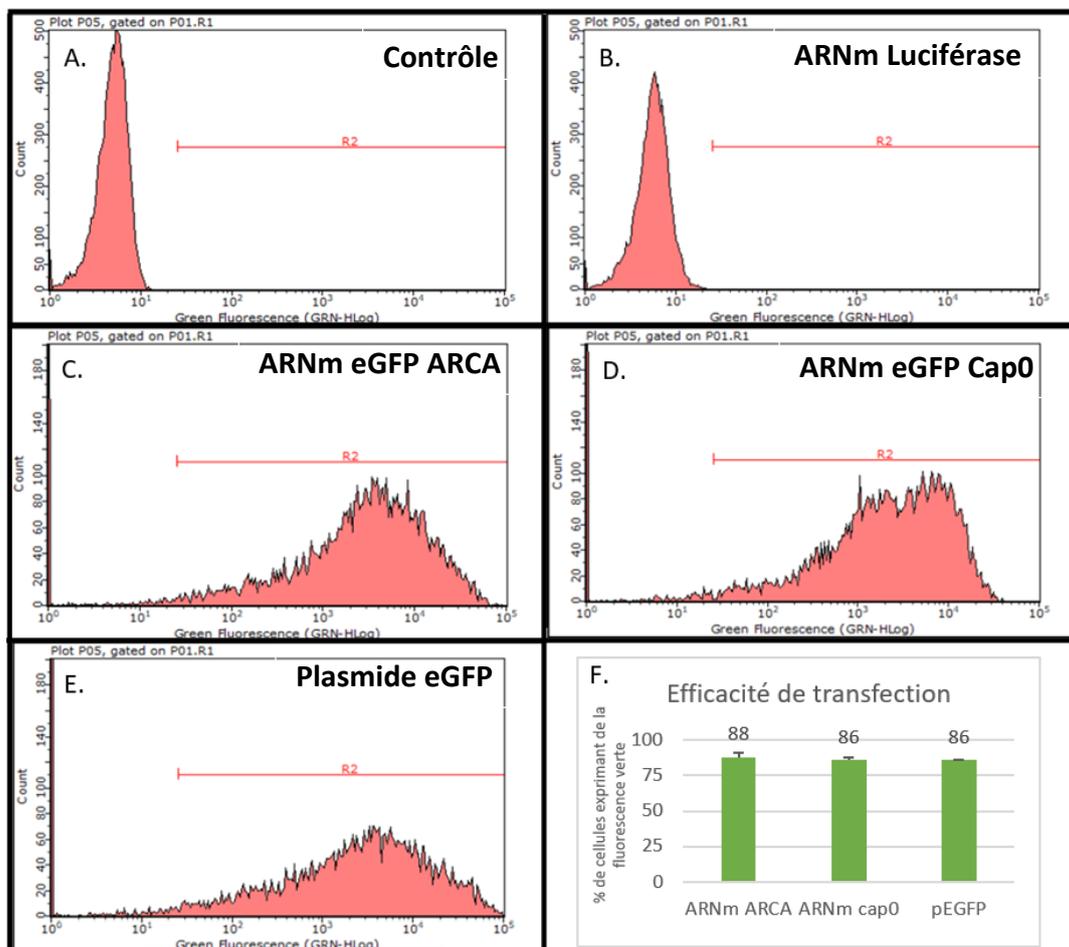


Figure 16 : Expression de fluorescence verte observée au cytomètre en flux

Pourcentage de fluorescence verte observée au cytomètre en flux après transfection de cellules B16 avec de l'ARNm contenant la séquence codant la GFP.

A. NaCl seul ; B. ARNm codant la luciférase ; C. ARNm eGFP ARCA ; D. ARNm eGFP Cap0 ; E. Plasmide eGFP ; F. Efficacité de transfection exprimée en pourcentage de cellules exprimant la GFP.

On peut voir dans un premier temps que les contrôles négatifs (NaCl et ARNm luciférase ne permettent pas l'expression de la protéine GFP comme attendu (Fig. 16A et 16B). Les deux ARNm comportant la séquence de la GFP testés ainsi que le plasmide pEGFP (utilisé ici comme contrôle positif de transfection) se sont montrés efficaces pour permettre l'expression de cette protéine dans les cellules B16 transfectées. Les ARNm eGFP-ARCA, eGFP-Cap0 et le plasmide pEGFP ont permis de faire exprimer la GFP dans respectivement 88%, 86% et 86% des cellules transfectées.

On peut donc conclure que la formulation d'ARNm avec le liposome DMAPAP/DOPE est efficace pour exprimer la protéine GFP, sans observer de différences majeures liées à la coiffe.

3.2.2.2. Etude de l'expression de la luciférase par la transfection d'ARNm

Dans un deuxième temps, afin d'étudier la transfection d'une autre protéine que la GFP, différents ARNm portant la séquence codant la luciférase ont été transfectés avec un liposome DMAPAP/DOPE au rapport de charge $R_{\pm} = 6$. Le but de l'expérience était ici de comparer plusieurs ARNm afin d'observer d'éventuelles différences liées à leur structure ou leurs conditions de stockage. Pour cela nous avons transfecté l'ARNm dont la synthèse a été effectuée *in vitro* au laboratoire (Cf. §3.1 p.64) qui comporte une coiffe ARCA et pas de nucléotides modifiés ainsi que des ARNm commerciaux comportant des nucléotides modifiés, portant différentes coiffes (ARCA, Cap0 ou Cap1). L'intérêt ici est de comparer l'efficacité de transfection de tous ces ARNm et l'objectif secondaire est de comparer les deux lots d'ARNm portant la coiffe Cap0, qui ont été commandés il y a plusieurs années pour celui appelé ultérieurement « Ancien » ou commandé plus récemment pour celui appelé « Récent ».

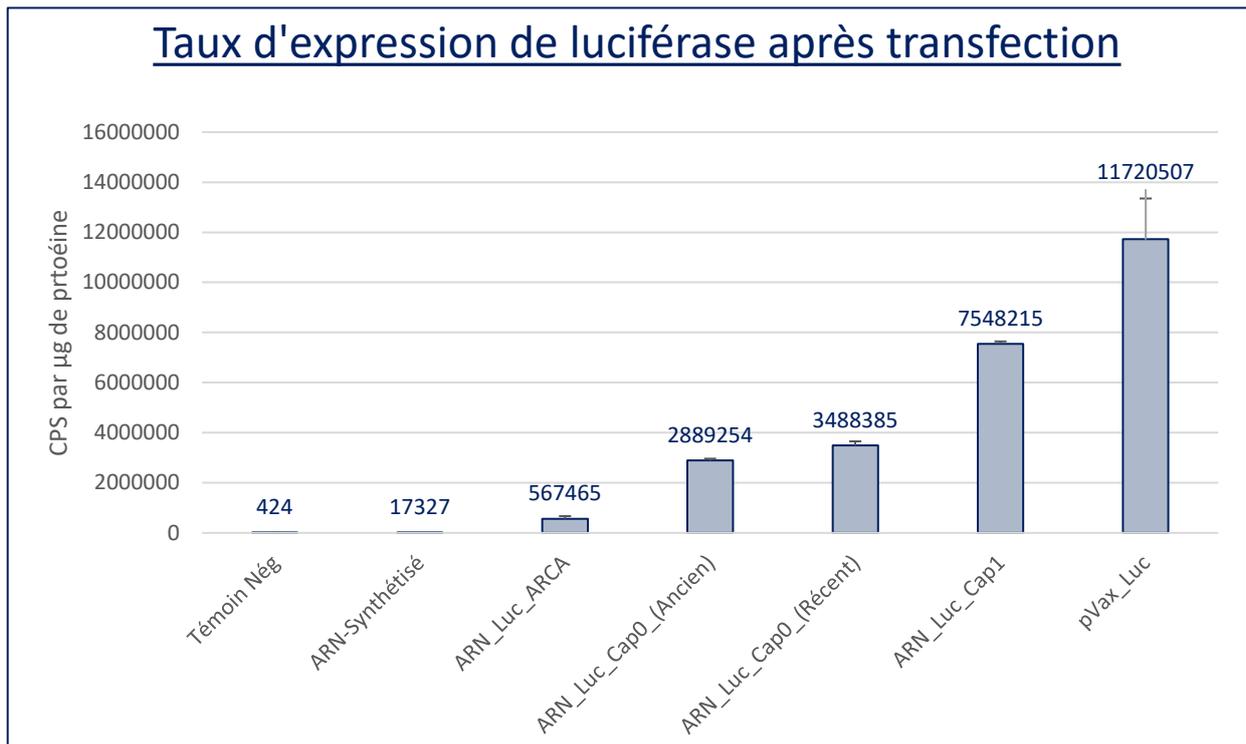


Figure 17 : Activité luciférase en coups par seconde par µg de protéines

Des cellules B16, préalablementensemencées à 60 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits sont transfectées par des lipoplexes composés de 0,5µg d'ARNm Luc ou de plasmide pVaxLuc par puits et des liposomes DMAPAP/DOPE à un rapport de charge $R_{\pm} = 6$.

Cette expérience montre que tous les ARNm utilisés sont efficaces pour produire une protéine luciférase fonctionnelle, cependant, on peut observer de grosses différences d'efficacité de transfection entre les différents ARNm (Figure 18). En effet, l'ARNm synthétisé est beaucoup moins exprimé que les ARNm achetés. Cela peut être expliqué par l'absence de nucléotides modifiés en comparaison avec les ARNm commerciaux mais aussi par la qualité de la purification qui serait moindre. Concernant les ARNm commerciaux, on observe une différence selon la coiffe : L'ARNm comportant une coiffe ARCA est beaucoup moins bien exprimé que les ARNm portant des coiffes Cap0, eux-mêmes étant moins bien exprimés que l'ARNm portant la coiffe Cap1. Cependant nous n'observons pas de franche différence entre les deux ARNm Cap0 (ancien et récent) car ils semblent relativement proches en termes d'efficacité ce qui confirme la qualité du stockage et des précautions d'utilisation de notre matériel.

Cette expérience nous a permis de démontrer que l'ARNm Fluc Cap1 est le plus efficace c'est pourquoi nous avons choisi de le conserver pour les études *in vivo*. Pour la suite des expériences de mise au point *in vitro* nous avons utilisé l'ARNm Fluc Cap0 « Récent ».

3.2.3. Caractérisation de l'efficacité de transfection d'ARNm avec des dérivés du liposome cationique DMAPAP/DOPE

Après avoir déterminé le rapport de charge idéal pour transfecter un plasmide avec le liposome DMAPAP/DOPE, puis avoir analysé les différents niveaux d'expressions avec les ARNm, l'idée est d'étudier maintenant précisément le liposome afin d'optimiser l'efficacité de transfection. Pour cela, différents liposomes dérivés du DMAPAP/DOPE ont été synthétisés afin d'y rajouter des éléments permettant d'améliorer la transfection ou d'augmenter leur stabilité.

Nous avons choisi d'utiliser le DMAPAP/DOPE classique, un dérivé couplé à la céramide et au PEG, un autre dérivé couplé au lipide cationique C14:0 PEG2000 PE et enfin un autre dérivé couplé au cholestérol, la céramide et le PEG comme décrit plus haut (Cf. §2.2 p.56). Ces ajouts de molécules permettent d'augmenter la stabilité du lipoplexe et d'allonger le temps de demi-vie dans la circulation. Le PEG permet entre autres de masquer les charges, le cholestérol permet d'améliorer la stabilité du complexe en augmentant la rigidité et la céramide permet de stabiliser le complexe ce qui améliore l'efficacité de transfection *in vivo*⁹¹⁻⁹³.

Cette expérience consiste à transfecter des cellules B16 avec de l'ARNm Luc Cap0 avec différents liposomes puis d'observer le taux d'expression de la luciférase après ajout de luciférine. En complément de la première expérience qui a permis de mettre en avant le rapport de charge $R_{\pm} = 6$, nous avons choisi d'étudier un panel de rapports de charge $R_{\pm} = 4, 5$ ou 6 afin de déterminer l'optimum pour chaque liposome.

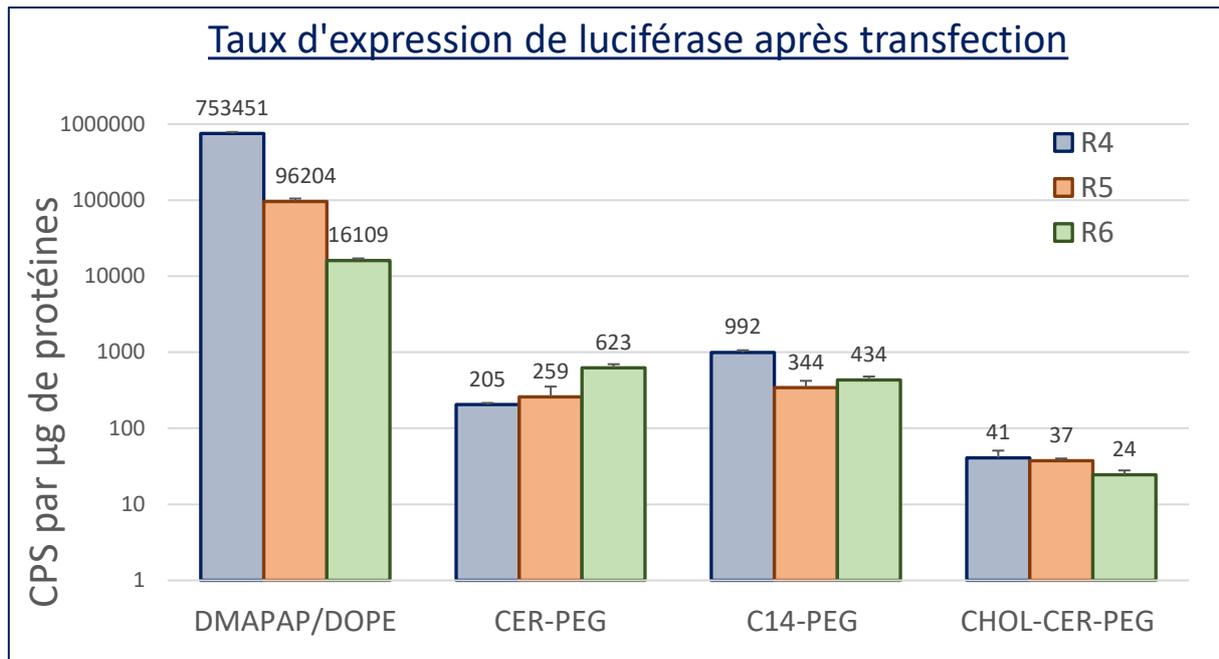


Figure 18 : Activité luciférase en coups par seconde par μg de protéines.

Des cellules B16, préalablement ensemencées à 60 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits sont transfectées par des lipoplexes composés de $0,5\mu\text{g}$ d'ARNm Luc cap0 par puits et des liposomes DMAPAP/DOPE ; CER-PEG ; C14-PEG ; CHOL-CER-PEG avec un rapport de charge $R_{\pm} = 4, 5$ ou 6 . Expérience réalisée deux fois avec des résultats semblables.

Le liposome DMAPAP/DOPE (en bleu) semble présenter une efficacité fortement supérieure aux autres liposomes. De plus on observe ici un optimum pour $R_{\pm} = 4$ ce qui remet en question l'expérience précédente qui montrait un optimum pour $R_{\pm} = 6$. Les autres formulations présentent une efficacité plus réduite et des rapports de charge moins performants. Par exemple, le liposome couplé à la céramide et au PEG (en orange) semble présenter un optimum pour $R_{\pm} = 6$. Le liposome couplé au lipide C14 et au PEG (en vert) semble présenter un optimum pour $R_{\pm} = 4$. Enfin, le liposome couplé à la céramide et au cholestérol (en jaune) semble présenter un optimum pour $R_{\pm} = 6$.

3.3. Transfections In-Vivo

Le troisième objectif de ce projet est d'injecter de l'ARNm *in vivo* et d'observer la production protéique pour valider le vecteur. Pour cela nous avons décidé dans un premier temps de tester l'efficacité du modèle en injectant 15µg de plasmide pVax-Luc (qui contient la séquence codant la protéine de la luciférase) par électroporation dans le muscle tibial-crânial. 24 heures après l'injection, les souris sont réinjectées avec de la luciférine et l'émission de photons est quantifiée à l'aide de l'appareil Bioslabs.

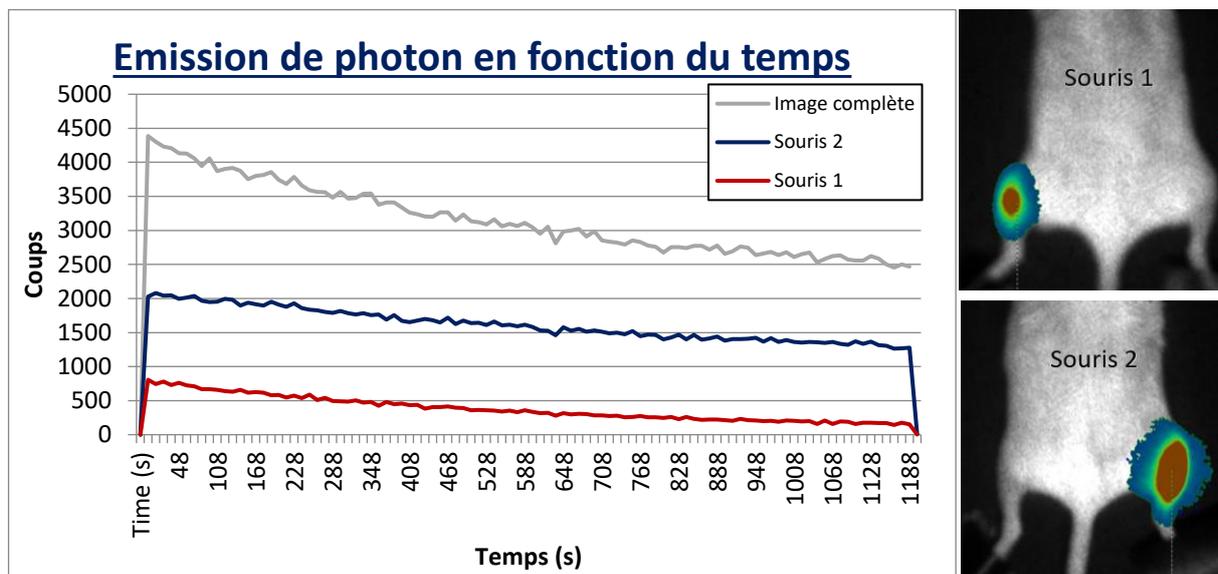


Figure 19 : Transfections in vivo de plasmides exprimant la luciférase

Injection de 15µg de plasmide pVax-Luc par électroporation dans le muscle tibial-crânial de deux souris puis injection de 500µg de luciférine 24h plus tard. **Gauche** : Graphique représentant l'émission de photons par chaque souris en fonction du temps. **Droite** : Image montrant les photons émis tout au long de l'acquisition.

On observe chez les deux souris une émission de photons prolongée et spécifique de la patte transfectée ce qui montre une efficacité de la transfection. En effet, la protéine est produite spécifiquement et est fonctionnelle puisqu'elle permet l'émission de photons.

Maintenant que nous avons décrit le modèle et observé la capacité du plasmide pVaxLuc à permettre la production de luciférase, l'expérience suivante a pour objectif d'injecter dans le muscle tibial crânial un lipoplexe composé d'ARNm Fluc-Cap1 et du liposome DMAPAP/DOPE à un rapport de charge de $R_{\pm} = 5$ et d'observer la luminescence après injection de luciférine. Pour cela, les mêmes souris ont été réutilisées afin de respecter la réduction du nombre d'animaux et injectées dans l'autre patte.

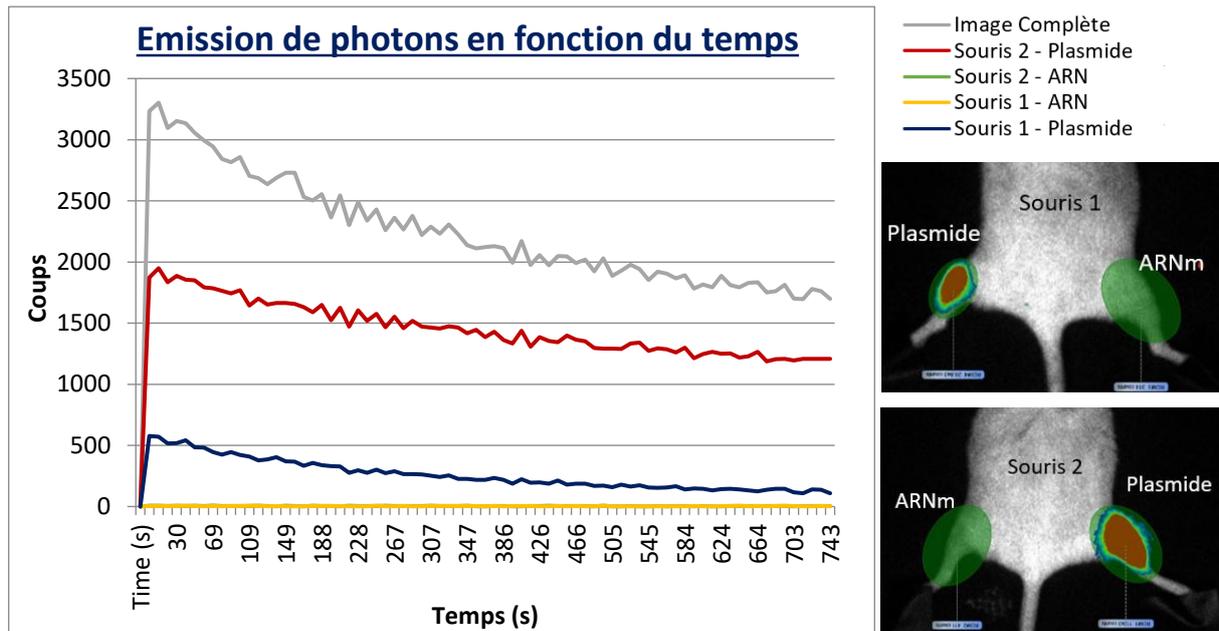


Figure 20: Transfections in vivo d'ARNm exprimant la luciférase

Quantification de l'émission de photons après transfection administration dans la patte droite de la souris 1 et gauche de la souris 2 d'un lipoplexe composé de $5\mu\text{g}$ ARNm Fluc-Cap1 et de DMAPAP/DOPE avec un rapport de charge $R_{\pm} = 5$ puis injection de luciférine 24h plus tard. **Gauche** : Graphique représentant l'émission de photons par chaque souris en fonction du temps. **Droite** : Image montrant les photons émis tout au long de l'acquisition.

On observe que seules les pattes ayant été transfectées au préalable avec le plasmide émettent de la luminescence ce qui témoigne de la stabilité du plasmide et de la synthèse et l'expression protéique. Cependant, la transfection d'ARNm avec la formulation testée (ARNm Fluc Cap1 et liposome DMAPAP/DOPE) n'a pas permis la production d'une protéine de luciférase fonctionnelle.

Même si *in vitro* le liposome DMAPAP/DOPE semblait montrer une efficacité plus élevée pour transférer l'ARNm, l'idée est maintenant d'essayer le liposome dérivé du DMAPAP/DOPE couplé au lipide C14 et PEG. En effet, l'environnement du lipoplexe est dans un milieu différent et cette formulation pourrait être plus résistante à l'injection *in vivo*. De plus, la condition testée lors de la précédente transfection *in vivo* d'ARNm était à un rapport de charge $R_{\pm} = 5$, nous avons choisi de tester un rapport de charge beaucoup plus bas $R_{\pm} = 2$. Une troisième souris a donc reçu deux nouvelles formulations d'ARNm Fluc-Cap1 dans chaque patte et la quantité de photons émise après injection de luciférine a été quantifiée.

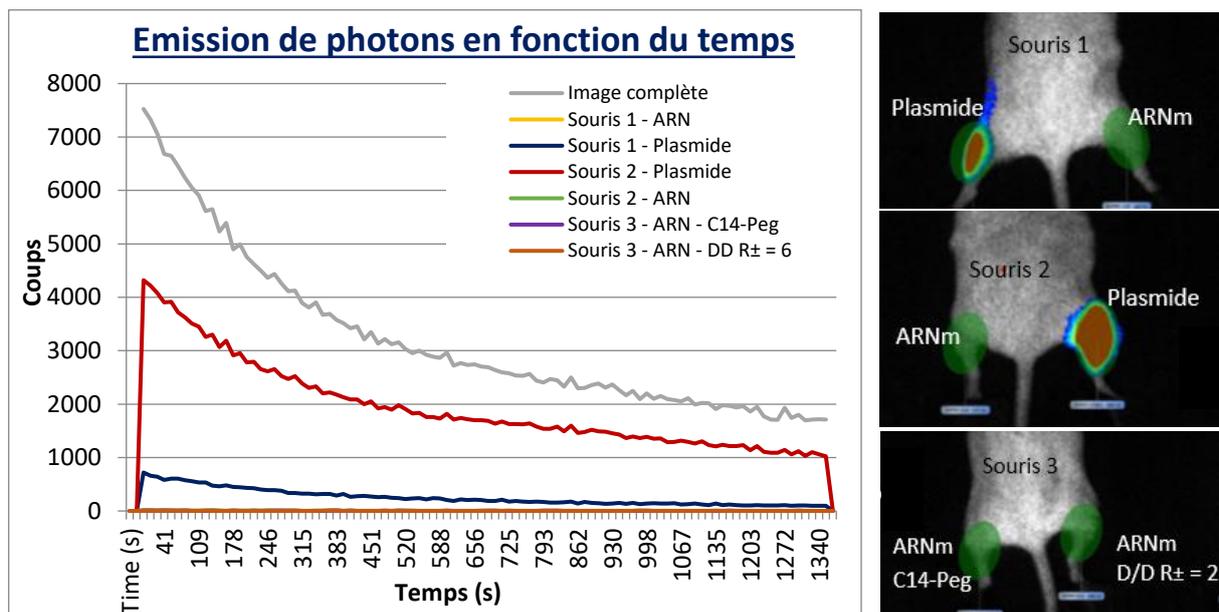


Figure 21: Transfections in vivo d'ARNm exprimant la luciférase

Quantification de l'émission de photons après transfection administration dans la patte droite de la souris 3 d'un lipoplexe composé de $5\mu\text{g}$ d'ARNm Fluc-Cap1 et de DMAPAP/DOPE avec un rapport de charge $R_{\pm} = 2$ et injection dans la patte gauche d'un lipoplexe composé de $5\mu\text{g}$ d'ARNm Fluc-Cap1 et du liposome DMAPAP/DOPE/CERAMIDE-PEG (1/1/0.06) avec un rapport de charge $R_{\pm} = 6$ puis injection de luciférine 24h plus tard. **En haut** : Graphique représentant l'émission de photons par chaque souris en fonction du temps. **En bas** : Image montrant les photos émis tout au long de l'acquisition.

On observe encore une fois que seules les pattes ayant été transfectées au préalable avec le plasmide émettent de la luminescence. La transfection d'ARNm avec ces deux formulations ne permet pas la production d'une protéine de luciférase fonctionnelle.

3.4. Evaluation de la toxicité cellulaire de la protéine Chagas

Enfin, le quatrième et dernier objectif de ce projet était de tester l'hypothèse d'une éventuelle toxicité de la protéine produite par le plasmide Chagas. En effet, la séquence mise en évidence *in silico* qui code un assemblage peptidique de 30 épitopes immunisants contre la maladie de Chagas a été synthétisée dans un plasmide lors d'expériences préalables et l'injection de ce plasmide chez la souris n'a pas permis d'entraîner l'immunisation de ces animaux. L'hypothèse à vérifier ici est donc que cet assemblage protéique entraînerait une toxicité lors de sa production ce qui conduirait à une dégradation de la protéine, voire à la mort cellulaire. Pour cela dans un premier temps nous avons transfecté des cellules avec les différents plasmides pour observer leur morphologie et leurs éventuels signes de souffrance cellulaire puis dans un deuxième temps nous avons effectué un test de viabilité cellulaire au MTT pour quantifier cette éventuelle toxicité.

3.4.1. Observation des cellules après transfection des plasmides « Chagas » :

Pour répondre à cette question, nous avons choisi dans un premier de transfecter des cellules B16 avec différents plasmides et d'observer visuellement l'effet sur la morphologie ainsi que l'émission de fluorescence. Les plasmides transfectés étaient les suivants :

- Le plasmide pEGFP, qui a démontré lors des premières expériences une efficacité de transfection de 86% ;
- Le plasmides pVax-GFP-Chagas-Myc et pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc qui comportent la séquence « Chagas » respectivement complète ou tronquée en C-Term (Car les derniers épitopes sont très hydrophobes).

Les cellules ont été transfectées avec des doses croissantes de ces différents plasmides, à l'aide du liposome DMAPAP/DOPE à un rapport de charge $R_{\pm}=6$. L'observation visuelle a été effectuée à différents temps à l'aide d'un microscope à fluorescence et documentée dans le tableau ci-dessous.

Quantité d'ADN	Plasmide	Temps post transfection			
		5h	21h	28h	48h
Contrôle	Contrôle	0	0	0	0
0,25µg	pEGFP	+	++	+++	+++
	pVax-GFP-Chagas-Myc	0	0	+	+
	pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc	0	0	+	+
0,5µg	pEGFP	++	++	+++	+++
	pVax-GFP-Chagas-Myc	0	0	+	+
	pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc	0	0	+	+
1µg	pEGFP	++	+++	++++	++++
	pVax-GFP-Chagas-Myc	0	0	++	++
	pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc	0	0	++	++

Légende :

- Niveau de fluorescence croissant : 0 ; + ; ++ ; +++
- Niveau de souffrance cellulaire croissant : ☹️ ; ☹️☹️ ; ☹️☹️☹️

Tableau 3 : Observation visuelle de la toxicité cellulaire résultant de transfections.

Description de l'aspect visuel des cellules et de leur intensité de fluorescence émise, par observation au microscope, à différents temps après transfection. Transfection de 1µg, 0,5µg ou 0,25 µg par puits des plasmides pEGFP, pVax-GFP-Chagas-Myc ou pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc) à l'aide du liposome DMAPAP/DOPE avec un rapport de charge R±=6.

Cette expérience a permis de montrer la présence d'une toxicité liée à la transfection car les cellules transfectées meurent plus rapidement et que celles présentes dans les puits non transfectés des conditions contrôles. Le plasmide pEGFP ayant préalablement montré son efficacité (Quantification au FACS de 86% de cellules transfectées après transfection de 0,5µg de plasmide) permet ici de mettre en évidence la relation dose-dépendante de la toxicité car les puits traités avec 1µg de plasmides présentent davantage de signes de souffrance cellulaire.

On n'observe pas de différences notables entre les plasmides pVax-GFP-CHAGAS-Myc et pVax-GFP-Chagas tronqué-Myc ce qui écarte pour le moment l'idée que la toxicité est liée aux derniers épitopes.

De plus, on a pu observer que la localisation du signal de fluorescence varie entre les différents plasmides. En effet, pour le plasmide GFP, toute la cellule est fluorescente tandis que pour les deux plasmides CHAGAS, le signal de fluorescence est périnucléaire. Cela peut-être un argument en faveur de l'absence de sécrétion de la protéine car cette présence majoritairement autour du noyau montre qu'elle n'est pas prise en charge ni déplacée au sein de la cellule.

3.4.2. Evaluation de la viabilité cellulaire avec le test au MTT

Après avoir observé au microscope la toxicité liée à la transfection nous avons souhaité la quantifier à l'aide d'un test de viabilité cellulaire. Pour continuer à étudier l'éventuelle toxicité liée à la transfection avec les plasmides comportant la séquence « Chagas », nous avons décidé d'effectuer un test au MTT qui témoigne de la viabilité cellulaire au travers de l'activité mitochondriale. Le sel de tétrazolium MTT est réduit en formazan par la déshydrogénase mitochondriale des cellules viables ce qui forme un précipité violet dosable par spectrométrie optique à 570nm. La quantité de précipité obtenue est donc révélatrice de la quantité de cellules vivantes.

Le but étant d'évaluer la toxicité cellulaire liée à la transfection et à la production de la protéine « Chagas », nous avons transfecté les cellules avec les plasmides suivants : pEGFP, pVax-GFP-Chagas-Myc et pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc, pVax-Chagas-myc, pToxA et pToxB.

Tout d'abord, le plasmide pEGFP sert de contrôle positif de la transfection car il est facilement possible d'évaluer l'efficacité de transfection visuellement au microscope à fluorescence et il sert également à déterminer la toxicité basale liée la transfection.

De plus, nous avons choisi d'utiliser trois plasmides comportant la séquence « Chagas » qui présentent des différences structurales (séquence « Chagas » entière ou tronquée, plasmide en présence ou non de la séquence de la GFP) afin d'évaluer l'impact de chaque séquence dans la toxicité cellulaire liée à la production protéique.

Enfin, deux plasmides qui contiennent chacun une partie de la séquence codant la toxine botulique (pToxA et pToxB) sont utilisés ici afin de comparer la toxicité cellulaire mais aussi d'évaluer si cette toxicité est liée au fait que la protéine produite soit sécrétée ou non. En effet, la protéine produite par le plasmide pToxA est sécrétée alors que celle produite par le pToxB ne l'est pas.

On observe ainsi le pourcentage de cellules vivantes après transfection de cellules B16 pendant 72h à l'aide du liposome DMAPAP/DOPE à un rapport de charge $R\pm=6$ avec des doses croissantes d'ADN (0,06 μ g ; 0,125 μ g ; 0,25 μ g ; 0,5 μ g ; 1 μ g).

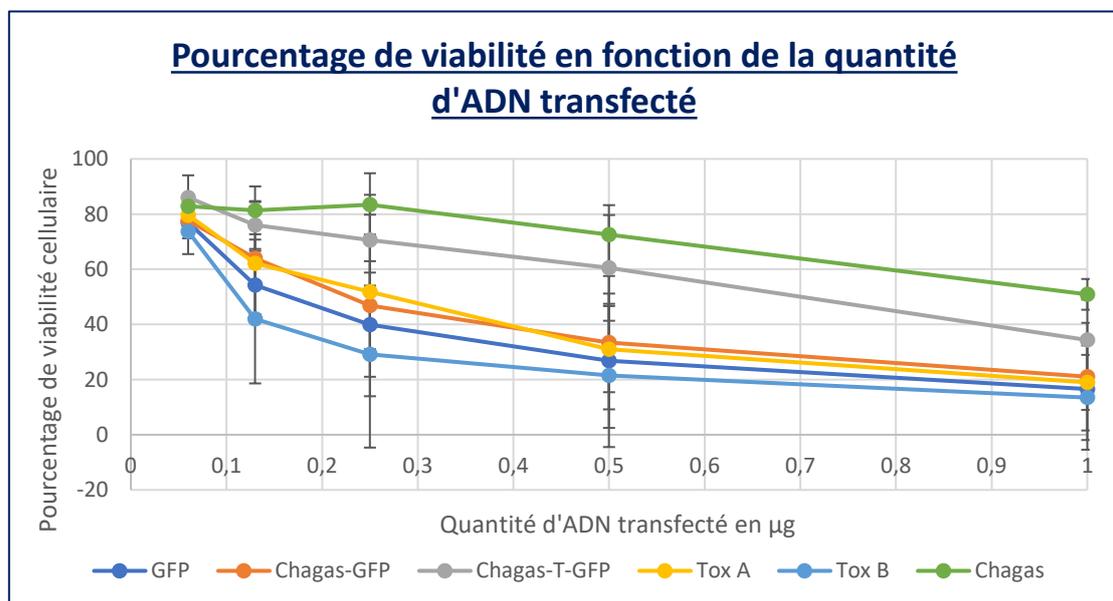


Figure 22 : Pourcentage de viabilité cellulaire après transfection.

Graphique représentant le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la quantité d'ADN transfecté. Transfection de cellules B16 avec différents plasmides (pEGFP, Chagas-GFP, Chagas-tronqué-GFP, ToxA, ToxB, Chagas à l'aide du liposome DMAPAP/DOPE à un rapport de charges $R\pm=6$. Moyennes effectuées sur 3 répétitions de l'expérience.

Après comparaison des pourcentages de viabilité cellulaire, aucune différence significative n'est observée entre les différents plasmides. Cependant on peut observer une tendance indiquant que la transfection de deux des plasmides portant la séquence « Chagas » (pVax-GFP-ChagasTronqué-Myc en gris et pVax-Chagas-myc en vert) semble moins toxique que les autres transfusions notamment avec les plasmides contrôles. Cela induit l'idée que l'hypothèse de la toxicité liée à la synthèse protéique de la séquence « Chagas » serait à rejeter.

Un indicateur de toxicité pertinent dans ce cas est l'IC50 aussi connu comme la concentration inhibitrice médiane. Cet indicateur permet, dans l'expérience précédente, d'indiquer la concentration d'ADN qui diminue de moitié la viabilité cellulaire.

Plasmide	IC 50 (en µg d'ADN transfecté)
GFP	0,17
Chagas-GFP	0,23
Chagas-Tronqué-GFP	0,64
Chagas	1,02
ToxB	0,11
ToxA	0,27

Tableau 4 : Quantité d'ADN transfecté entraînant une survie de 50% des cellules

L'étude de l'IC 50, ne semble pas indiquer que les plasmides portant la séquence « Chagas » entraînent une toxicité supérieure au plasmide contrôle GFP ou aux plasmides codant les fragments de la toxine botulique. De plus, il semblerait même ici que la toxicité soit liée à la protéine GFP étant donné que le plasmide codant le peptide « Chagas » seul est entre quatre et cinq fois moins toxique que son homologue « Chagas-GFP ». Etrangement, cela est en contradiction avec les observations précédentes qui montraient visuellement une majoration de la souffrance cellulaire dans les conditions transfectées avec les plasmides « Chagas » comparé au plasmides GFP.

Enfin, on retrouve jusqu'à un facteur dix entre l'IC50 du plasmide « Chagas » et le plasmide codant le fragment de la toxine botulique ToxB ce qui montre que l'hypothèse de la toxicité du polypeptide « Chagas » semble être à réfuter.

1. Discussion des résultats

L'objectif de ce stage était d'étudier différentes formulations à base de liposomes cationiques pour faire exprimer efficacement une protéine d'intérêt à partir d'ARNm dans des cellules. Pour cela des transfections cellulaires ont été effectuées et l'expression des protéines d'intérêt a été analysée pour comparer l'efficacité des liposomes. Ensuite, des transfections ont été réalisées chez la souris pour observer la production de luciférase *in-vivo*. Enfin, la transfection de plasmides produisant une protéine immunisant contre la maladie de Chagas a été étudiée afin de comprendre l'absence d'immunité après son administration *in-vivo*.

1.1. Transfections *in-vitro*

Lors de la transfection de plasmide pVaxLuc, on observe une activité de la luciférase seulement dans les puits ayant été transfectés avec des lipoplexes ce qui démontre l'efficacité du lipoplexe à permettre la production de luciférase. On observe un rapport de charge optimal pour $R_{\pm} = 6$, (Fig. 2). De nombreux facteurs peuvent entraîner sa modification comme l'état des cellules, du liposome ou des variabilités dues aux manipulations.

Lors de la transfection des ARNm codant la luciférase, on observe des niveaux d'efficacité variables selon les ARNm. L'ARNm Fluc Cap1 semble plus efficace, alors que l'ARNm ARCA semble le moins efficace. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que certains ARNm ont été stockés plusieurs années alors que le Fluc Cap1 est neuf par exemple. De plus, la différence d'efficacité peut se jouer sur le fait qu'ils ne portent pas les mêmes coiffes (ARCA, Cap0 ou Cap1), une structure nécessaire qu'il est indispensable de rajouter à un ARNm synthétique car absente du plasmide initial servant à la production. Le rôle de la coiffe est de protéger l'ARNm contre une digestion précoce par les nucléases, d'éviter une prise en charge par le système immunitaire, permet la liaison à l'*eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) pour initier la traduction en protéine⁴⁷. Les différentes structures se différencient par

la méthylation en 2' des deux avant-derniers nucléosides pour cap0, cap1 et cap2 (Fig. 4). La coiffe ARCA, qui signifie « Anti-Reverse Cap Analogs » contient un groupe méthyl en 3' sur le dernier nucléoside qui évite l'incorporation de la coiffe dans une orientation inversée, ce qui empêcherait une bonne traduction (Fig. 4) ^{47,94}. Enfin, les différents ARNm utilisés ont aussi été améliorés avec des nucléotides modifiés tels que la pseudouridine, la 5-méthoxyuridine ou encore la 5-méthylcytidine ce qui joue un rôle dans la vitesse de dégradation et qui leur permet d'échapper au système immunitaire.

Concernant la GFP, la fluorescence est observée dans tout le cytoplasme. On n'observe pas de différence apparente entre les ARNm (Des ARNm portant les coiffes ARCA ou Cap0 ont été testées) car la fluorescence liée à la GFP n'est pas quantitative et la saturation de la fluorescence écrase les éventuelles différences préalablement observées pour la luciférase.

Lors de la transfection avec les différents liposomes cationiques, on observe que tous les lipoplexes permettent la production de luciférase fonctionnelle. Le liposome DMAPAP/DOPE semble être plus efficace que les autres, cependant cette expérience réalisée *in vitro* n'est peut-être pas représentative de ce qu'il se passe *in vivo*⁹⁵. En effet, il a été montré que le cholestérol a une action de rigidité et permet l'augmenter le temps de stabilité du liposome⁴⁰. De plus, l'ajout du PEG permet de masquer les charges du lipide cationique et ainsi augmenter le temps de présence dans la circulation en empêchant l'agrégation et les interactions non spécifiques^{40,96}. Il est donc pertinent de continuer à développer de nouveaux liposomes dérivés qui sont combinés à des agents améliorant la transfection *in vivo*.

Enfin, il serait aussi pertinent d'évaluer l'efficacité de transfection de ces liposomes dans d'autres lignées cellulaires et notamment des lignées cellules humaines telle que les HEK293 par exemple. En effet, il est important de multiplier les modèles afin d'obtenir des résultats robustes permettant de s'assurer de la reproductibilité chez l'homme.

1.2. Transfections *in-vivo*

L'administration du plasmide pVax-Luc par électroporation entraîne une production de protéines luciférase fonctionnelles comme attendu⁹⁷. Cette production de luciférase est durable car lorsque les souris ont été réutilisées pour transférer l'autre patte, une semaine après la première électroporation, l'injection de luciférine entraînait toujours une émission de photons dans la première patte injectée. Cela n'est pas forcément un atout recherché lors de la vaccination car il n'est pas souhaitable d'avoir une production de l'antigène au long terme mais seulement dans un laps de temps nécessaire à l'activation d'une réponse immunitaire. C'est pourquoi il est plus pertinent de développer des vaccins à base d'ARN car leur durée d'action est limitée dans le temps du fait de leur dégradation, ainsi la protéine antigénique produite ne sera pas présente longtemps dans le corps.

Cependant, lors de ces expériences, les différentes transfections d'ARNm n'ont pas entraîné l'expression de luciférase notable et quantifiable. De nombreux paramètres restent à optimiser pour améliorer ces résultats et réellement observer la production de la protéine d'intérêt *in vivo*. Tout d'abord, la quantité d'ARNm transférée pourrait être augmentée afin de compenser la quantité perdue par dégradation précoce. De plus, il reste une grande marge de possibilités concernant les modifications pouvant être induites sur les liposomes ainsi que sur le rapport de charge utilisé. Enfin, comme dans de nombreux modèles, il est pertinent d'étudier si le modèle animal est le plus adapté. Ici la souris Swiss est utilisée mais les résultats pourraient être différents sur une autre souche voire sur une autre espèce animale.

1.3. Peptide Chagas

La transfection d'une construction plasmidique codant un assemblage protéique associant 30 épitopes du pathogène responsable de la maladie de Chagas n'a pas entraîné d'immunisation des souris alors que l'injection des épitopes individuellement synthétisés *in vitro* entraîne une réponse immunitaire. Lors de la transfection cellulaire de cette construction plasmidique, les cellules expriment des signes de souffrance cellulaire voire ne survivent pas ce qui pourrait témoigner d'une toxicité liée à la transfection ou à la protéine produite. Pour entraîner une réaction immunitaire, il est nécessaire que la protéine soit sécrétée, afin de rentrer en contact avec des cellules du système immunitaire. L'hypothèse émise dans ce

projet pour expliquer la toxicité observée *in vitro* est que l'absence de sécrétion ne stimulerait pas le système immunitaire tout en produisant une accumulation de la protéine produite dans la cellule. L'observation au microscope de la fluorescence émise après transfection du plasmide exprimant la GFP ou la séquence « Chagas » couplée à la GFP nous montre que la protéine n'est pas autant produite car la fluorescence est bien inférieure aux cellules contrôles transfectées avec le plasmide GFP. Cela peut être expliqué par la taille de la protéine à produire, en effet la séquence « Chagas » comporte 1590 nucléotides auxquels s'ajoutent aussi l'étiquette de la GFP et Myc alors que dans le plasmide contrôle, la séquence codant la GFP ne contient que 713 nucléotides. Il serait intéressant d'aller vérifier si la protéine est correctement produite en effectuant éventuellement des analyses de spectrométrie de masse.

Le test de toxicité au MTT a permis de comparer les transfections des différents plasmides Chagas avec des plasmides faisant exprimer les toxines botuliques A et B ainsi que la GFP seule. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans la viabilité des cellules selon les différents plasmides étudiés, et donc que le peptide Chagas n'entraîne pas spécialement de sur-toxicité en comparaison avec les toxines botuliques A et B. Cependant, après électroporation des plasmides codant les fragments de toxine botulique A et B *in vivo* chez la souris, une réaction du système immunitaire a été observée. Cela infirme donc l'hypothèse que l'assemblage peptidique Chagas n'entraîne pas de réponse immunitaire du fait de sa toxicité. Les prochaines étapes consistent à rechercher un problème au niveau de la sécrétion, d'une éventuelle dégradation de la construction peptidique par le protéasome avant la sécrétion ou encore d'une mauvaise traduction, un repli de l'assemblage protéique après sa traduction...

2. Conclusion et perspectives :

Pour réduire et terminer l'épidémie de la maladie de Chagas, il est pertinent de maintenir et renforcer les actions de prévention qui passent majoritairement par le contrôle des vecteurs (triatomes) en association avec le développement de ce vaccin.

Ce projet très prometteur permettra d'encourager l'utilisation d'ARNm à des fins de vaccination une fois que la formulation sera mise au point et qu'un vecteur lipidique adapté sera conçu. Pour aller plus loin dans le développement de ce vaccin contre la maladie de Chagas il convient tout d'abord d'étudier plus en détails la séquence peptidique afin d'optimiser sa traduction et sa sécrétion. Il serait éventuellement intéressant d'étudier l'expression de la séquence « Chagas » par parties afin de regarder si certains épitopes entraînent une toxicité individuellement. Dans un second temps il serait aussi envisageable d'étudier des lipides cationiques dépendants du pH tels que ceux utilisés lors de la formulation des vaccins prévenant le Covid-19.

3. Les challenges de la vaccination :

La vaccination est l'un des développements sanitaires majeurs ayant permis à notre société de repousser l'espérance de vie et d'évoluer dans un monde en meilleure santé. Comme discuté précédemment dans l'introduction, de nombreuses évolutions ont été observées au cours de l'histoire de la vaccination, au fur et à mesure des découvertes adjacentes notamment en immunologie et infectiologie ce qui nous permet aujourd'hui d'avoir un panel de vaccins protégeant contre des dizaines de pathologies.

L'intérêt de la vaccination est double. En effet, la protection apportée par ces médicaments est à la fois personnelle, car elle évite à l'individu vacciné de développer la pathologie ou réduire les formes grave mais elle est aussi générale, au niveau de la société. Cette immunité collective permet de protéger les personnes ne pouvant pas bénéficier d'une vaccination fonctionnelle du fait de leur état de santé ou leur âge par exemple (Immunodépression, grossesse...) en réduisant la circulation du pathogène dans la population ce qui réduit le risque d'infection.

Malheureusement, depuis quelques années se développe en France une réticence envers la vaccination en général, principalement chez les enfants. Cette réticence souvent basée sur des informations faussées démontre de l'importance d'un accès à l'information fiable et aux dangers d'internet qui laisse place au complotisme et au partage d'informations détournées.

Le vaccinoscepticisme, souvent décrit comme un luxe de pays développés, s'explique aussi par une individualisation de la société, repoussant les bienfaits de l'immunité collective en faveur d'une peur du risque associé au vaccins. En effet, comme tout médicament, la balance bénéfice-risque est présente mais il n'est plus à prouver scientifiquement qu'elle penche envers la vaccination collective pour de nombreux vaccins. Dans l'esprit de la population, le bénéfice est invisible du fait de l'oubli des précédentes épidémies historiques et la perception du risque prend le dessus ce qui entraîne cette réticence. Enfin, les polémiques telles que la gestion de l'épidémie de grippe aviaire H1N1 en 2009 ou encore les scandales sanitaires ont favorisé l'hésitation de la population et diminué la confiance de la société envers les instances de décision en santé.

C'est dans ce contexte d'incertitude et de scepticisme que s'est installée la pandémie de Covid-19 en 2020, qui a mis en évidence les manquements en termes d'informations de la population aux nouvelles thérapies. Le développement des vaccins prévenant le Covid-19 et notamment les vaccins à ARNm s'est effectué de manière rapide (Deux vaccins ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) moins d'un an après le début de la pandémie), efficace et fortement médiatisé. La majeure partie de la population ayant considéré cette rapidité comme un risque face à cette peur de l'inconnu ce qui est devenu du pain béni pour le charlatanisme et le complotisme principalement sur internet. Les vaccins à ARNm qui sont, comme expliqué plus haut, plus simple à développer et à produire sont aussi plus sécuritaires pour le patient et le personnel qui le manipule.

La pandémie liée au Covid-19 que nous venons de traverser est un exemple pertinent montrant l'intérêt de développer de nouveaux types de vaccins, plus sûrs, tant pour le receveur que pour l'agent au niveau de la production. De nombreuses maladies infectieuses émergentes ou résistantes aux vaccins conventionnels peuvent entraîner des répercussions à différents niveaux, sur la santé et la mortalité de la population mais aussi sur l'activité économique de la société notamment lors des confinements. En plus de leur atout au niveau de la sécurité, les vaccins à ARN sont moins chers, plus rapides à produire, et maniables aux

mutations et variants. Cette capacité d'adaptation facile et rapide en fait une parfaite alternative, en parallèle des vaccins conventionnels.

Un des rares points positifs de la pandémie de Covid-19 est qu'elle a permis de mettre la lumière sur cette technique et a boosté la recherche et l'industrialisation des thérapies à ARNm. Cela est un tremplin plein d'espoir pour d'autres pathologies, telles que la maladie de Chagas ou encore Ebola, Zika et le VIH mais aussi pour des pathologies non infectieuses comme de nombreux cancers par exemple.

Bibliographie:

1. Mills, R. M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *Am. J. Med.* **133**, 1262–1265 (2020).
2. Bern, C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* **373**, 456–466 (2015).
3. Ramsey, J. & Schofield, C. Control of Chagas disease vectors. *Salud Pública México* **6** (2003).
4. Pérez-Molina, J. A. & Molina, I. Chagas disease. *The Lancet* **391**, 82–94 (2018).
5. Moretti, N. S., Mortara, R. A. & Schenkman, S. Trypanosoma cruzi. *Trends Parasitol.* **36**, 404–405 (2020).
6. American Trypanosomiasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html> (2021).
7. de Oliveira, R. B. & Meneghelli, U. G. Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease. **93**, 6 (1998).
8. Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J. & Engman, D. M. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **14**, 421–447 (2019).
9. Pinazo, M. J. *et al.* Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic. *Gastroenterol. Hepatol.* **33**, 191–200 (2010).
10. Bonney, K. & Engman, D. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Curr. Mol. Med.* **8**, 510–518 (2008).
11. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simões, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* **115**, 1109–1123 (2007).
12. Norman, F. F. & López-Vélez, R. Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. *J. Travel Med.* **26**, taz060 (2019).
13. Pérez-Molina, J. A., Crespillo-Andújar, C., Bosch-Nicolau, P. & Molina, I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* **39**, 458–470 (2021).
14. Michel-Todó, L. *et al.* In silico Design of an Epitope-Based Vaccine Ensemble for Chagas Disease. *Front. Immunol.* **10**, 2698 (2019).
15. Dumonteil, E. & Herrera, C. The Case for the Development of a Chagas Disease Vaccine: Why? How? When? *Trop. Med. Infect. Dis.* **6**, 16 (2021).
16. Brumpt E. Immunité partielle dans les infections à Trypanosoma cruzi, transmission de ce trypanosome par Cimex rotundus. Rôle régulateur des hôtes en intermédiaires. *Bull. Société Pathologies Exot.* 93–100 (1913).
17. Maldonado, E., Morales-Pison, S., Urbina, F. & Solari, A. Vaccine Design against Chagas Disease Focused on the Use of Nucleic Acids. *Vaccines* **10**, 587 (2022).
18. Bivona, A. E., Alberti, A. S., Cerny, N., Trinitario, S. N. & Malchiodi, E. L. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient Trypanosoma cruzi immune-mediated control. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165658 (2020).
19. Canoui, E. & Launay, O. Histoire et principes de la vaccination. *Rev. Mal. Respir.* **36**, 74–81 (2019).
20. Donnelly, R. F. Vaccine delivery systems. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 17–18 (2017).
21. Guérin, N. Histoire de la vaccination: de l'empirisme aux vaccins recombinants. *Rev. Médecine Interne* **28**, 3–8 (2007).
22. Plotkin, S. History of vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12283–12287 (2014).

23. Plotkin, S. A. Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* **11**, S5–S11 (2005).
24. Pollard, A. J. & Bijker, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 83–100 (2021).
25. *Immunologie fondamentale et immunopathologie: enseignements thématique et intégré tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention.* (Elsevier Masson, 2018).
26. Brenner, S., Jacob, F. & Meselson, M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* **190**, 576–581 (1961).
27. Weng, Y. *et al.* The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnol. Adv.* **40**, 107534 (2020).
28. Wolff, J. A. *et al.* Direct Gene Transfer into Mouse Muscle In-Vivo. *SCIENCE*, **247**, 1465–1468 (1990).
29. Martinon, F. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1719–1722 (1993).
30. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S.-H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7511–7526 (2016).
31. Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M. & Marques, M. P. C. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine* **39**, 2190–2200 (2021).
32. Liu, A. & Wang, X. The Pivotal Role of Chemical Modifications in mRNA Therapeutics. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 11 (2022).
33. Sergeeva, O. V., Koteliansky, V. E. & Zatsepin, T. S. mRNA-based therapeutics—Advances and perspectives. *Biochem. Mosc.* **81**, 709–722 (2016).
34. Beckert, B. & Masquida, B. Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. in *RNA* (ed. Nielsen, H.) vol. 703 29–41 (Humana Press, 2011).
35. Krieg, P. A. & Melton, D. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7057–7070 (1984).
36. Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M. & Kallen, K.-J. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* **9**, 1319–1330 (2012).
37. Pascolo, S. Messenger RNA-based vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 1285–1294 (2004).
38. Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, e142–e142 (2011).
39. Liu, M. A. DNA vaccines: a review. *J. Intern. Med.* **9** (2003).
40. Ho, W. *et al.* Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* 2001812 (2021) doi:10.1002/adhm.202001812.
41. Geall, A. J., Mandl, C. W. & Ulmer, J. B. RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin. Immunol.* **25**, 152–159 (2013).
42. Probst, J. *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* **14**, 1175–1180 (2007).
43. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 261–279 (2018).
44. Liu, A. Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines* **7**, 37 (2019).
45. Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C. & Thakur, A. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics* **12**, 102 (2020).
46. Muttach, F., Muthmann, N. & Rentmeister, A. Synthetic mRNA capping. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 2819–2832 (2017).

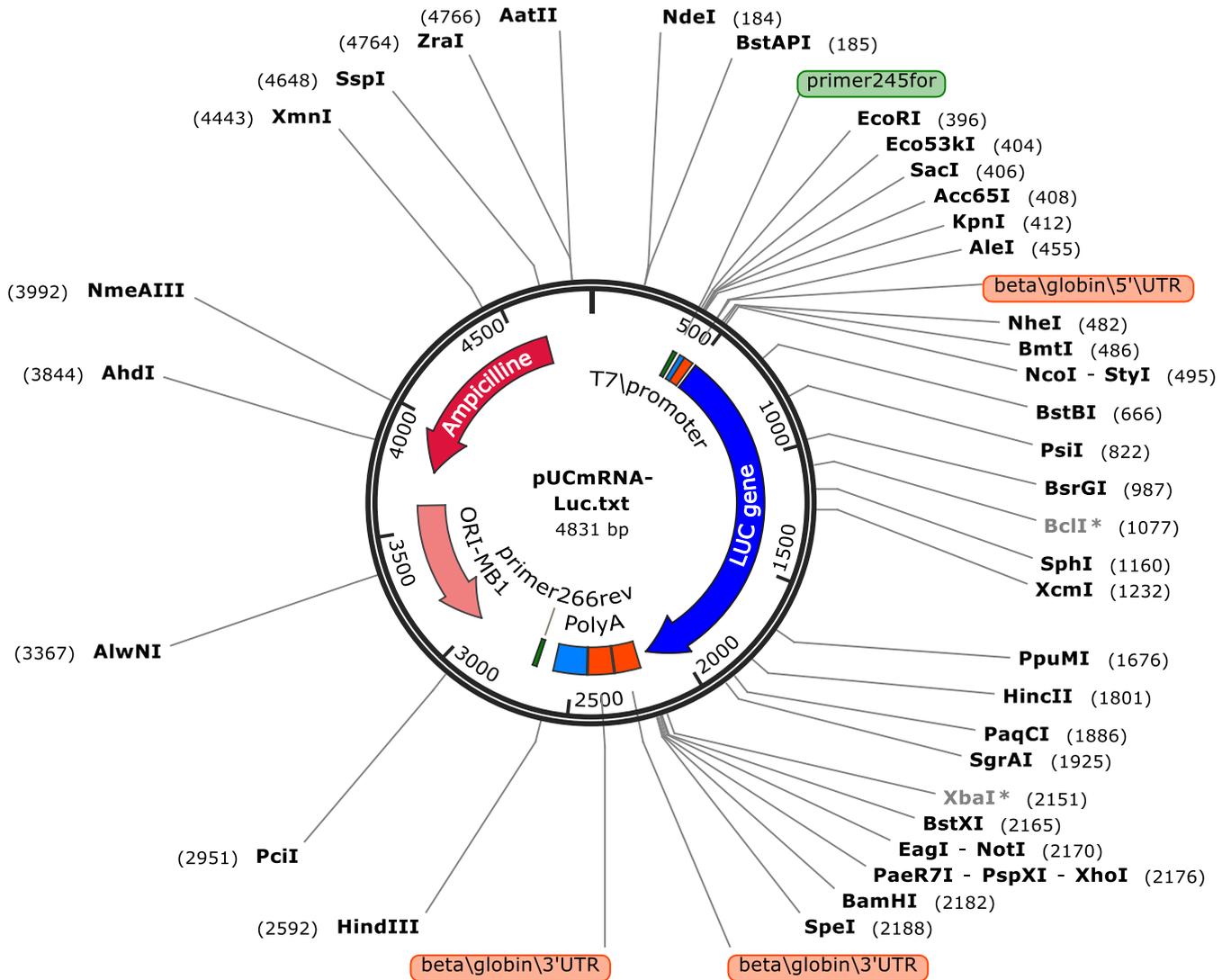
47. Zhong, Z. *et al.* mRNA therapeutics deliver a hopeful message. *Nano Today* **23**, 16–39 (2018).
48. Züst, R. *et al.* Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137–143 (2011).
49. Grudzien-Nogalska, E., Jemielity, J., Kowalska, J., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *RNA* **13**, 1745–1755 (2007).
50. Warminski, M. *et al.* The synthesis of isopropylidene mRNA cap analogs modified with phosphorothioate moiety and their evaluation as promoters of mRNA translation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 3753–3758 (2013).
51. Rydzik, A. M. *et al.* Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety—fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1699–1710 (2012).
52. Kowalska, J. *et al.* Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10245–10264 (2014).
53. Gritsenko, A. A. *et al.* Sequence features of viral and human Internal Ribosome Entry Sites predictive of their activity. *PLOS Comput. Biol.* **13**, e1005734 (2017).
54. Scholten, K. B. J. *et al.* Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin. Immunol.* **119**, 135–145 (2006).
55. Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**, 346–353 (2004).
56. Svitkin, Y. V. *et al.* N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6023–6036 (2017).
57. Strzelecka, D. *et al.* Phosphodiester modifications in mRNA poly(A) tail prevent deadenylation without compromising protein expression. *RNA* **26**, 1815–1837 (2020).
58. Xu, S., Yang, K., Li, R. & Zhang, L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6582 (2020).
59. Suschak, J. J., Williams, J. A. & Schmaljohn, C. S. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 2837–2848 (2017).
60. Pardi, N., Hogan, M. J. & Weissman, D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr. Opin. Immunol.* **65**, 14–20 (2020).
61. Schott, J. W., Morgan, M., Galla, M. & Schambach, A. Viral and Synthetic RNA Vector Technologies and Applications. *Mol. Ther.* **24**, 1513–1527 (2016).
62. Ehrenguber, M. U., Schlesinger, S. & Lundstrom, K. Alphaviruses: Semliki Forest Virus and Sindbis Virus Vectors for Gene Transfer into Neurons. *Curr. Protoc. Neurosci.* **57**, (2011).
63. Rozovics, J. M. *et al.* Picornavirus Modification of a Host mRNA Decay Protein. *mBio* **3**, e00431-12 (2012).
64. Michel, T. *et al.* Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **8**, 459–468 (2017).
65. Jafari, M., Soltani, M., Naahidi, S., N. Karunaratne, D. & Chen, P. Nonviral Approach for Targeted Nucleic Acid Delivery. *Curr. Med. Chem.* **19**, 197–208 (2012).

66. Järver, P., Langel, K., El-Andaloussi, S. & Langel, Ü. Applications of cell-penetrating peptides in regulation of gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 770–774 (2007).
67. Saleh, A. F. *et al.* Improved Tat-mediated plasmid DNA transfer by fusion to LK15 peptide. *J. Controlled Release* **143**, 233–242 (2010).
68. Snyder, E. L. & Dowdy, S. F. Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery. *Pharm. Res.* **21**, 389–393 (2004).
69. Fawell, S. *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 664–668 (1994).
70. Derossi, D. *et al.* Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188–18193 (1996).
71. Moschos, S. A. *et al.* Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48–60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1450–1459 (2007).
72. Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L. & Anderson, D. G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol. Ther.* **27**, 710–728 (2019).
73. Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7297–7301 (1995).
74. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Controlled Release* **114**, 100–109 (2006).
75. Jiang, X., Abedi, K. & Shi, J. Polymeric nanoparticles for RNA delivery. in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* B9780128224250000000 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-822425-0.00017-8.
76. Dong, Y. *et al.* Poly(glycoamidoamine) Brushes Formulated Nanomaterials for Systemic siRNA and mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **16**, 842–848 (2016).
77. Arthur, J. F. *et al.* A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* **4**, 17–25 (1997).
78. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–IN27 (1965).
79. Gao, W., Hu, C.-M. J., Fang, R. H. & Zhang, L. Liposome-like nanostructures for drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **1**, 6569 (2013).
80. Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release* **160**, 117–134 (2012).
81. Cagnoni, P. J. Liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 81–86 (2002).
82. Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. & Bilgicer, B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol.* **32**, 32–45 (2014).
83. Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Ziyao. & Ho, R. J. Y. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* **103**, 29–52 (2014).
84. Barthélémy, P., Pitard, B. & Rocchi, P. Thérapies à ARN, un domaine thérapeutique en pleine expansion. *Les Dossiers de l'INSERM* <https://www.inserm.fr/dossier/therapies-a-arn/> (2022).
85. Polack, F. P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615 (2020).

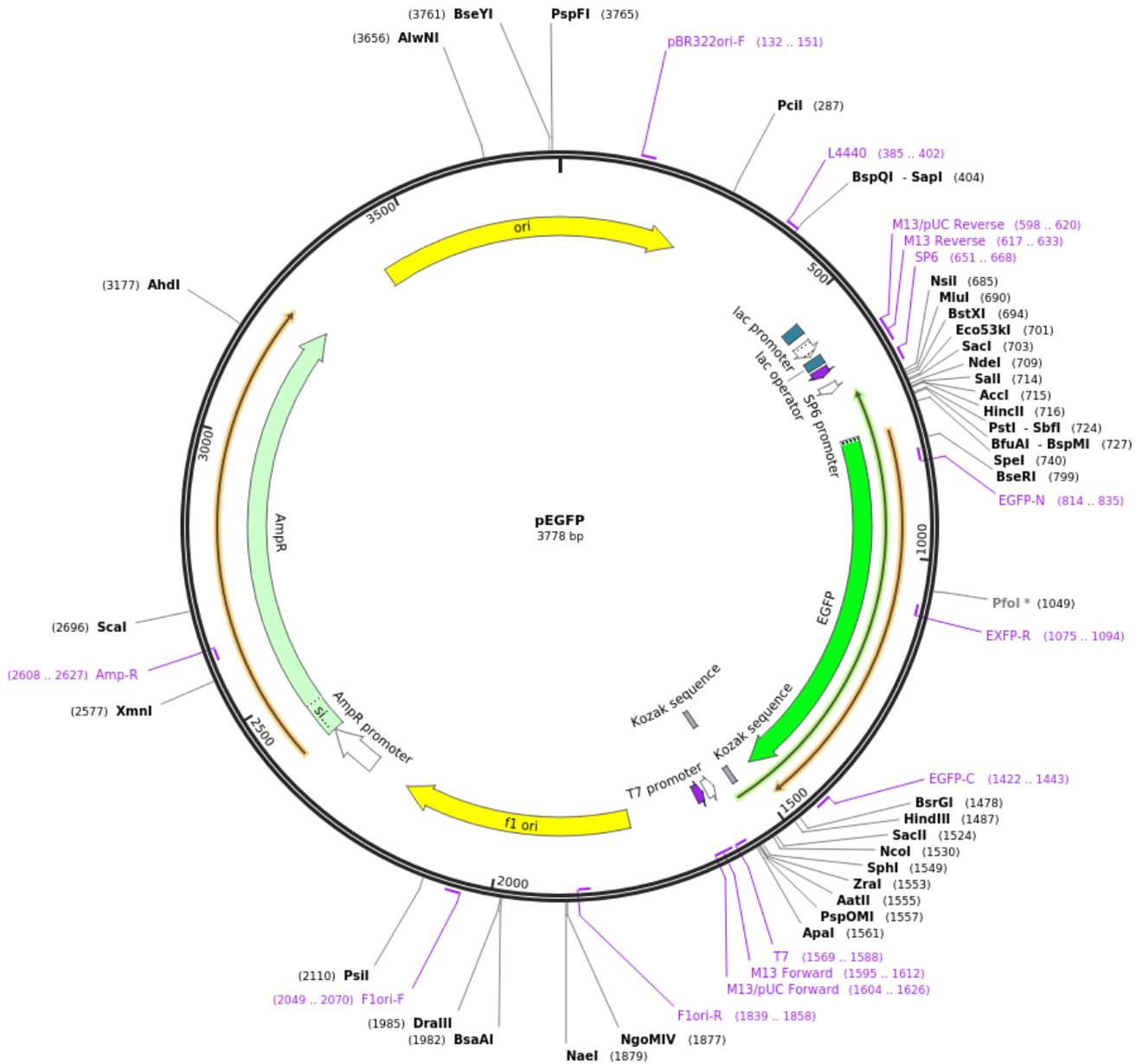
86. Baden, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403–416 (2021).
87. Trollmann, M. F. W. & Böckmann, R. A. mRNA lipid nanoparticle phase transition. *Biophys. J.* **121**, 3927–3939 (2022).
88. COMIRNATY 10 µg/dose dispers diluer p disper inj. <https://www.vidal.fr/https://www.vidal.fr/medicaments/comirnaty-10-mcg-dose-dispers-diluer-p-disper-inj-232501.html> (2023).
89. Byk, G. *et al.* Synthesis, Activity, and Structure–Activity Relationship Studies of Novel Cationic Lipids for DNA Transfer. *J. Med. Chem.* **41**, 224–235 (1998).
90. Schlegel, A. *et al.* Anionic polymers for decreased toxicity and enhanced in vivo delivery of siRNA complexed with cationic liposomes. *J. Controlled Release* **152**, 393–401 (2011).
91. Wheeler, J. J. *et al.* Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther.* **6**, 271–281 (1999).
92. Øverbye, A. *et al.* Ceramide-containing liposomes with doxorubicin: time and cell-dependent effect of C6 and C12 ceramide. *Oncotarget* **8**, 76921–76934 (2017).
93. Zolnik, B. S. *et al.* Rapid Distribution of Liposomal Short-Chain Ceramide in Vitro and in Vivo. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1709–1715 (2008).
94. Jemielity, J. Novel ‘anti-reverse’ cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 1108–1122 (2003).
95. Brgles, M., Šantak, M., Halassy, B., Forcic, D. & Tomašić, J. Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency. *Int. J. Nanomedicine* 393 (2012) doi:10.2147/IJN.S27471.
96. Wahane, A. *et al.* Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy. *Molecules* **25**, 2866 (2020).
97. Sokołowska, E. & Błachnio-Zabielska, A. U. A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2776 (2019).

Annexes :

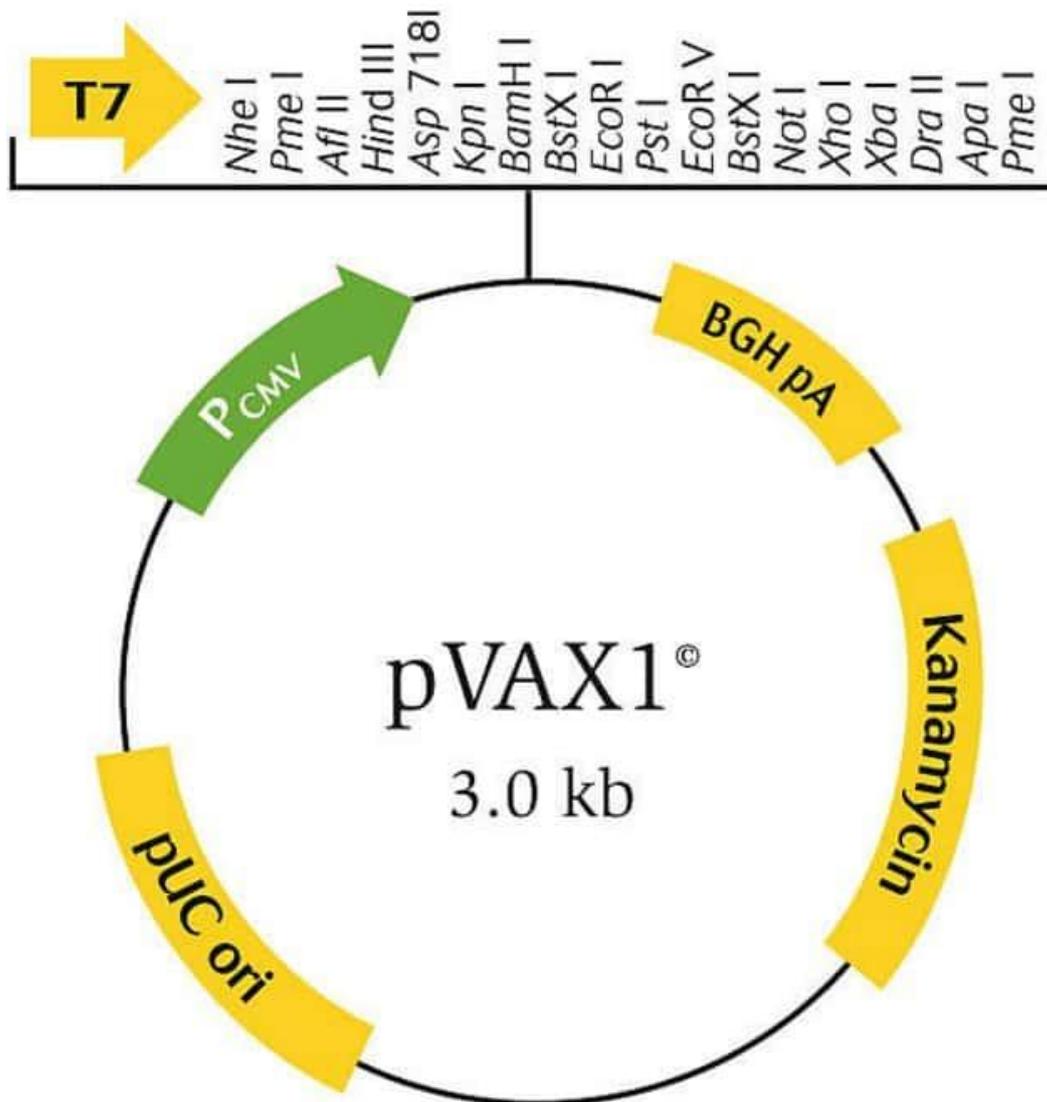
1. Carte du plasmide pUC-mRNA



2. Carte du plasmide pEGFP



3. Carte du plasmide pVax



Serment de Galien

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Signature de l'étudiant

Nom :

Prénom :

Du Président du jury

Nom :

Prénom :

Résumé

La rédaction de cette thèse porte sur un stage effectué au laboratoire U.T.C.B.S. qui s'inscrit dans un projet de recherche ayant pour finalité le développement d'un vaccin à ARNm contre la maladie de Chagas.

La maladie de Chagas fait encore aujourd'hui de nombreuses victimes, majoritairement en Amérique du Sud mais aussi partout ailleurs grâce à la mondialisation et des mouvements de population. Comme pour beaucoup de pathologies parasitaires, l'éradication de la maladie ne peut se faire que par un contrôle du vecteur et par le développement d'un vaccin.

Différents types de vaccins existent aujourd'hui et ont permis d'améliorer l'espérance de vie ainsi que la qualité de vie mais ils font face à des obstacles en termes de sécurité d'emploi, de production etc. Pour répondre à ces difficultés et augmenter le panel de pathologies prévenues par un vaccin il est utile de se tourner vers des nouvelles technologies et l'ARNm en a fait ses preuves lors de l'épidémie de Covid-19.

L'objectif de ce stage était dans un premier temps d'étudier plusieurs formulations pour vectoriser de l'ARNm ainsi que leurs transfections *in vitro* puis *in vivo*. Pour cela, l'efficacité de plusieurs liposomes cationiques a été étudiée *in vitro* pour vectoriser différents ARNm. Cependant après transfections d'ARNm portant la séquence codant la luciférase *in-vivo* chez la souris et injection de luciférase, aucune émission de photons n'a été observée ce qui témoigne d'une absence d'expression de la protéine d'intérêt.

Dans un deuxième temps l'objectif était d'étudier la transfection d'un plasmide portant la séquence codant une construction protéique immunisant contre la maladie de Chagas. Les expériences effectuées ont permis d'éliminer l'hypothèse d'une toxicité liée à la transfection, l'absence d'immunisation des souris après transfection pourrait donc être liée à une mauvaise traduction ou une élimination rapide de la protéine par le protéasome.

Mots-clefs: ARNm ; Vaccination ; Transfection ; Liposomes cationiques ; Vectorisation ; Chagas.