

Nanotaxi® pour les vaccins ARN et ADN

Bruno Pitard

CRCINA, CNRS, Inserm, Université d'Angers,
Université de Nantes,
22 boulevard Bénoni Goullin, 44200 Nantes,
France.

bruno.pitard@univ-nantes.fr



► La vaccination utilisant des acides nucléiques s'est développée au cours des dernières décennies. Elle représente une méthode prometteuse et particulièrement attractive pour prévenir ou guérir des maladies infectieuses ou cancéreuses. Cette approche a suscité un regain d'intérêt mondial au cours de ces dernières années, suite aux progrès réalisés dans la compréhension du système immunitaire humain. Les vaccins à base d'acides nucléiques reposent essentiellement sur deux types de molécules, ADN et ARN messager (ARNm), qui, lorsqu'elles sont injectées chez un individu, permettent la synthèse de la protéine immunogénique. La principale différence entre les vaccins à ADN et à ARNm réside dans le compartiment cellulaire où ces molécules doivent parvenir pour être actives : le noyau pour l'ADN, et le cytoplasme pour l'ARNm. Les difficultés communes rencontrées afin de rendre ces vaccins efficaces sont le franchissement de la barrière cellulaire par les acides nucléiques pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, et la nécessité d'augmenter leur immunogénicité.

Les vaccins à ADN

Les vaccins à ADN sont composés d'une simple molécule d'ADN plasmidique circulaire fermée, contenant un gène codant la protéine immunogénique, et dont l'expression est contrôlée par un puissant promoteur. Cette technique d'ADN plasmidique est peu coûteuse, robuste, simple d'utilisation, et possède un excellent profil d'innocuité lors des différents essais cliniques. Depuis les travaux pionniers de Jon Wolff [1],

ce mode d'administration de l'immunogène *in vivo*, par l'intermédiaire d'une molécule d'ADN injectée, a fait l'objet de nombreuses études précliniques contre des cibles variées dans le domaine des maladies infectieuses et de l'oncologie. Cependant, les résultats prometteurs obtenus chez les petits animaux n'ont pas été reproduits chez l'homme. Dans un premier temps, cela a été attribué à une expression insuffisante de l'immunogène codé par l'ADN chez l'individu vacciné, même si des doses de plusieurs milligrammes d'ADN étaient utilisées dans les essais cliniques : typiquement de 1 à 5 mg d'ADN par injection, ce qui correspond à des doses allant de 0,014 à 0,07 mg d'ADN/kg pour un adulte de 70 kg et représente 100 fois moins d'ADN que la dose efficace chez la souris (1-4 mg d'ADN/kg). Les travaux de plusieurs groupes de recherche ont permis d'augmenter la quantité d'immunogène produite, et ainsi d'accroître progressivement l'immunogénicité des vaccins à ADN : stratégies d'optimisation du squelette de l'ADN plasmidique, mais aussi mise au point de nouvelles méthodes d'administration de ces vaccins telles que l'électroporation du tissu d'injection [2]. Cependant, ces améliorations n'ont pas permis d'atteindre le niveau d'immunogénicité souhaité chez l'homme, ce qui a motivé la mise au point de méthodes plus appropriées pour renforcer la réponse immunitaire induite par les vaccins à ADN.

Les vaccins à ARNm

Les vaccins à ARNm utilisent des molécules linéaires comportant une extré-

mité 5' pourvue d'une coiffe protégeant l'ARNm et recrutant le ribosome, la séquence codant l'immunogène, et une extrémité 3' constituée d'une séquence de polyadénosine augmentant la stabilité des molécules. Les molécules d'ARNm sont produites par transcription enzymatique *in vitro* à partir d'ADN plasmidique. Le procédé de production des vaccins à ARNm comporte donc une étape supplémentaire par rapport à la production de vaccins à ADN, qui utilisent directement les molécules d'ADN plasmidique produites. Les molécules d'ARNm sont environ 5 fois plus petites que les molécules d'ADN utilisées pour la vaccination.

Néanmoins, le développement de cette nouvelle génération de vaccins à ARNm ou à ADN nécessite encore de nouvelles méthodes pour augmenter l'expression et l'immunogénicité de la protéine produite. À ce jour, aucun vaccin à base d'ADN ou d'ARNm n'a entraîné une protection suffisante dans des essais cliniques de phase III chez l'homme. En revanche, quatre vaccins à ADN ont reçu les autorisations réglementaires nécessaires à leur exploitation commerciale pour protéger les saumons d'élevage contre la nécrose hématopoïétique infectieuse et contre une maladie du pancréas due à un sous-type d'alphavirus, les poulets contre la grippe aviaire, et pour traiter des chiens atteints d'un mélanome buccal.

Signaux de danger

Obtenir une grande quantité d'immunogène à partir de l'ADN ou de l'ARNm injecté ne constitue malheureusement

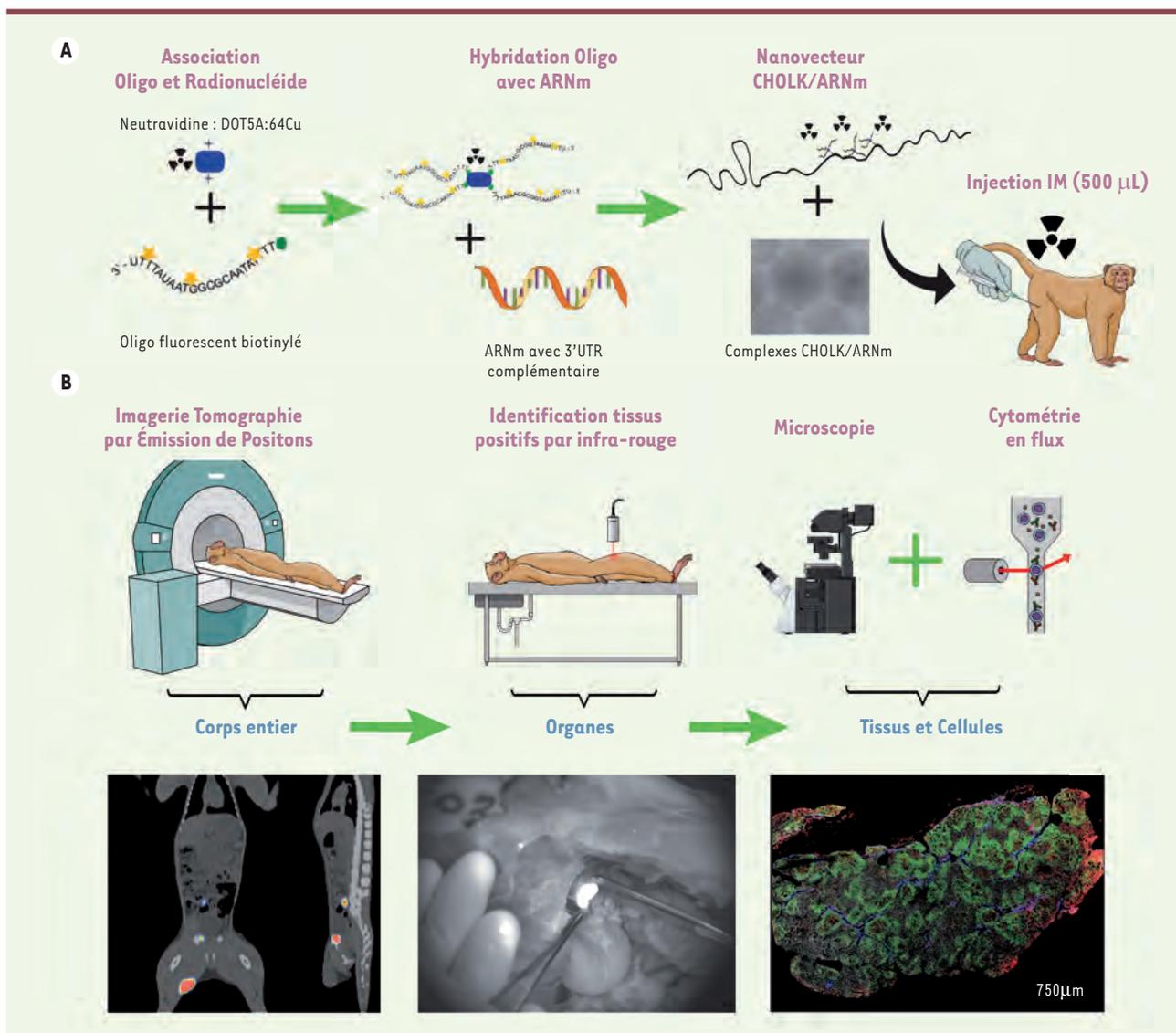


Figure 1. Méthode originale non-invasive chez le macaque cynomolgus pour le suivi spatio-temporel d'un nanovecteur transportant des molécules d'ARNm marquées par une sonde multidimensionnelle. **A.** Représentation schématique du marquage des molécules d'ARNm avec une sonde radioactive/proche infrarouge (^{64}Cu /dylight680) et association au nanovecteur CHOLK. **B.** Représentation schématique du suivi en imagerie par tomographie d'émission de positons corps entier, puis identification des tissus ayant incorporé les molécules d'ARNm avec une caméra portable proche infrarouge et enfin extraction des tissus pour analyse cellulaire par microscopie et cytométrie en flux. Les images en bas de la figure illustrent les données collectées à chaque étape, et montrent la dynamique du transport des ARNm avec CHOLK : ces ARNm ont parcouru environ 9 cm par rapport au site d'injection, et ont atteint les ganglions lymphatiques para-aortiques.

qu'une partie de la solution pour améliorer l'immunogénicité des vaccins à base d'acides nucléiques. De façon comparable à ce qui se passe au cours d'une infection bactérienne ou virale, l'activation de récepteurs de l'immunité innée, qui déclenche un « signal de danger », constituerait une condition préalable à une forte réponse immunitaire adap-

tative. Cet « effet inné » est une étape essentielle pour créer un environnement local contenant des cytokines et des interférons pro-inflammatoires, propice au recrutement et à l'activation adéquate des cellules immunitaires contre un agent pathogène ou une tumeur. Un vaccin à acides nucléiques idéal ne devrait donc pas seulement délivrer

l'acide nucléique codant l'antigène cible à tout type de cellules susceptibles de contribuer à l'expression et/ou à la présentation de l'antigène au système immunitaire, mais également activer suffisamment les capteurs de danger exprimés par ces cellules. Les « capteurs de danger » pour l'ADN et l'ARNm ne sont pas les mêmes et

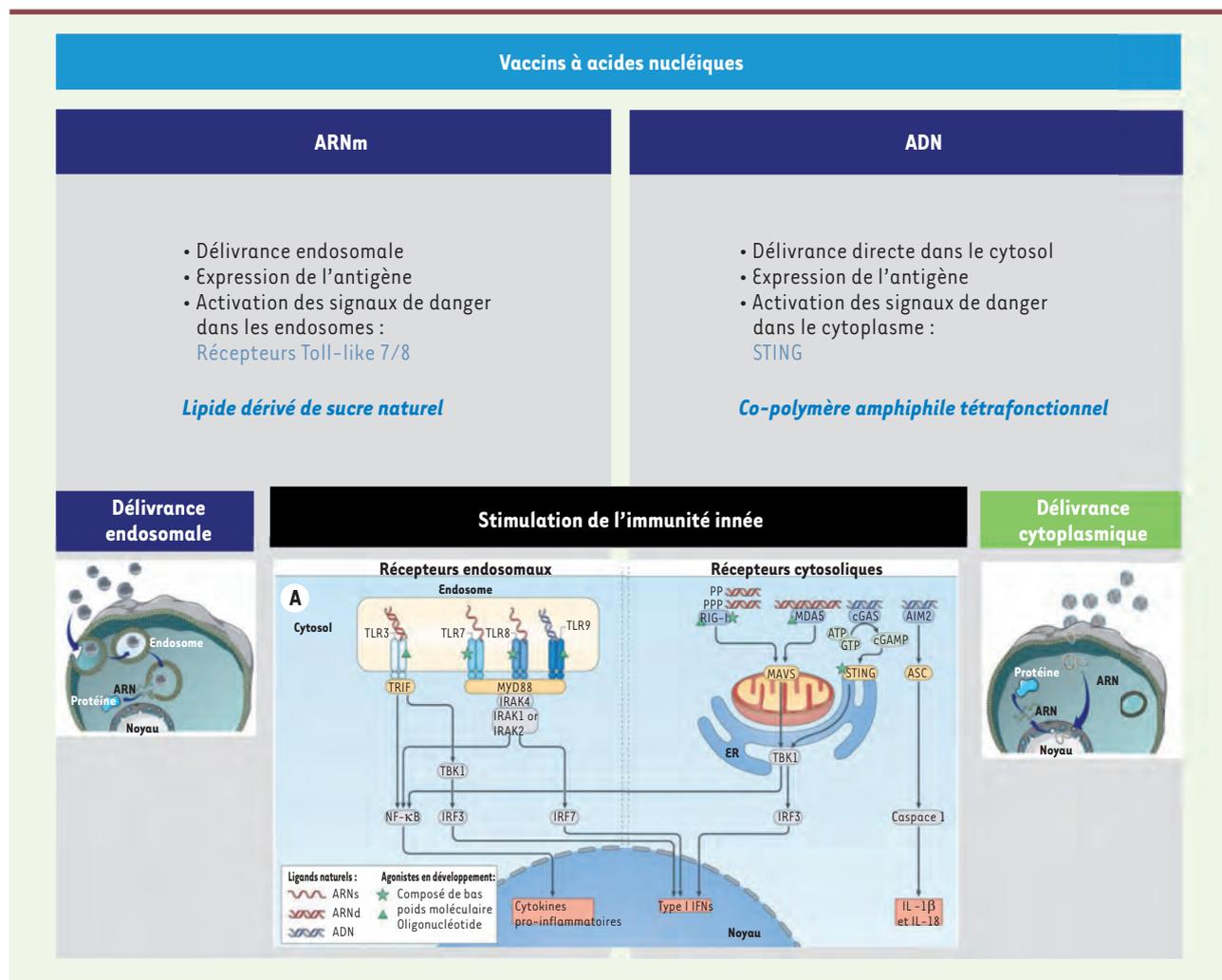


Figure 2. Les deux types de vaccins à base d'acides nucléiques nécessitent des systèmes de vectorisation synthétiques différents en fonction de la nature de l'acide nucléique codant l'antigène et de la localisation cellulaire des capteurs biologiques de danger correspondants, afin d'activer au mieux ces capteurs, et optimiser ainsi la réponse immunitaire.

sont localisés à des endroits différents de la cellule [3]. En situation physiologique, les molécules d'ADN constituant le génome sont localisées dans le noyau des cellules, et les capteurs en charge de la détection de molécules d'ADN étrangères sont donc localisés en dehors du noyau, majoritairement dans le cytoplasme: cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes*), DHX (*DEAH box nucleic acid helicase*), AIM2 (*absent in melanoma 2*)... Inversement, les molécules d'ARNm mature assurant la synthèse des protéines sont localisées dans le cytoplasme, et

les capteurs de danger pour la détection d'ARNm exogènes sont situés majoritairement dans les endosomes (TLR7/8, *Toll-like receptors 7 et 8*) afin d'éviter des réactions inflammatoires chroniques. Cette différence nous a conduits à définir de nouvelles classes de vecteurs synthétiques capables de maximiser l'activation des signaux de danger en fonction de l'acide nucléique utilisé pour produire l'antigène. C'est ainsi que les molécules d'ADN constituant les vaccins devront être délivrées aux cellules directement dans le cytoplasme, tandis que les molécules d'ARNm

devront être ciblées dans les endosomes. Bien entendu, les molécules d'ADN devront ensuite parvenir au noyau pour y être transcrites en ARNm et traduites en protéine immunogénique dans le cytoplasme, alors que les molécules d'ARNm devront sortir des endosomes pour être traduites en protéine immunogénique dans le cytoplasme. Quelles que soient les molécules d'acide nucléique utilisées, elles devront donc franchir deux membranes : les membranes plasmique et nucléaire pour l'ADN, la membrane plasmique et celle des endosomes pour l'ARNm.

Le transport d'ADN ou d'ARNm par nanovecteurs

Pour accomplir le transport direct dans le cytoplasme des molécules d'ADN et dans les endosomes pour les molécules d'ARNm, deux systèmes de vectorisation différents ont été inventés.

L'ADN plasmidique est vectorisé avec un copolymère amphiphile tétra-fonctionnel (en forme d'étoile), constitué de quatre blocs polymériques hydrophobes-hydrophiles centrés sur un cœur ionisable que nous avons nommé Nanotaxi®. Dans les modèles précliniques, cette formulation a démontré une augmentation de la production de protéines codées par l'ADN, et s'est avérée suivre un mécanisme de délivrance intracellulaire directe, ce qui optimise l'accès du vaccin aux capteurs de danger de l'ADN cytoplasmique. Nous avons démontré sa capacité à améliorer l'immunogénicité des vaccins à ADN dans de nombreux modèles comme ceux du cancer hépatocellulaire [4], d'asthme allergique [5], de cancer colorectal [6], de l'infection à *Mycobacterium abscessus* dans la mucoviscidose [7], ainsi que contre la protéine dérivée de la transposase codée par des néogènes humains [8], et contre le virus Zika [9]. Ce vaccin à base de copolymère amphiphile tétra-fonctionnel et d'ADN est actuellement en phase d'essai clinique dans le contexte de l'hépatocarcinome cellulaire, avec le gène codant l'antigène embryonnaire α -fœtoprotéine, qui est surexprimé chez 70 % des individus atteints de ce cancer. Les résultats de l'étude réglementaire d'innocuité ont démontré que le copolymère amphiphile tétra-fonctionnel seul ou en association avec l'ADN est très bien toléré, n'induisant ni mortalité ni toxicité.

L'ARNm est formulé avec une classe différente de molécules chimiques, certes toujours amphiphiles, mais de nature lipidique et non-polymérique. Dans une publication récente [10], grâce à une méthode originale non invasive chez le macaque par tomographie d'émission de positrons et imagerie infrarouge

(Figure 1), nous avons montré que le nanovecteur lipidique CHOLK (cholestérol-kanamycine), dérivé d'un sucre naturel, permet la délivrance d'ARNm dans les cellules présentatrices d'antigènes au niveau du site d'injection et des ganglions lymphatiques drainant ce site. Ce nanovecteur lipidique, constitué d'une molécule unique et non pas d'un mélange complexe d'adjuvants, conduit donc, par ses propriétés physico-chimiques, à la biodistribution idéale dans les ganglions lymphatiques et à la délivrance des molécules d'ARNm aux cellules clefs du système immunitaire, dans lesquelles a également été démontrée l'activation des signaux de danger spécifiques des ARNm et la synthèse de l'immunogène.

Conclusion

La vaccination à base d'acides nucléiques repose sur un processus complexe, où deux éléments doivent être pris en compte pour optimiser à la fois la production de l'immunogène et la stimulation de l'immunité innée créant un environnement propice à l'activation d'une réponse immune spécifique de l'immunogène. Les molécules d'ADN plasmidique et d'ARNm doivent respectivement transiter directement par le cytoplasme et par les endosomes des cellules cibles. Compte tenu de ces contraintes spatiales et des propriétés physico-chimiques différentes de l'ADN et des ARNm, deux systèmes synthétiques de délivrance différents ont été inventés, reposant respectivement sur des polymères amphiphiles en forme d'étoile et sur des lipides dérivés de sucres naturels (Figure 2).

Cette activité scientifique multidisciplinaire dédiée à la vaccination à base d'acides nucléiques devra être validée chez l'homme par des essais cliniques pour le futur développement de vaccins prophylactiques ou thérapeutiques utilisant une séquence informative instruisant le système immunitaire de l'individu vacciné. ♦

Nanotaxi® for RNA or DNA vaccines

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare être à l'origine de brevets et demandes de brevets revendiquant l'utilisation de molécules amphiphiles dérivées de sucres naturels et de copolymères amphiphiles pour la formulation d'acides nucléiques. L'auteur déclare également être co-fondateur d'In-Cell-Art.

RÉFÉRENCES

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990 ; 247 : 1465-8.
2. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 4262-7.
3. Wu J, Chen JZ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 2014 ; 32 : 461-8.
4. Cany J, Barteau B, Tran L, et al. AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. *J Hepatol* 2011 ; 54 : 115-21.
5. Beilvert F, Tissot A, Langelot M, et al. DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres reduce asthmatic response in a mouse model of allergic asthma. *Hum Gene Ther* 2012 ; 23 : 597-608.
6. Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, et al. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma. *PLoS One* 2011 ; 6 : e28842.
7. Le Moigne V, Rottman M, Goulard C, et al. Bacterial phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: the *Mycobacterium abscessus* model. *Vaccine* 2015 ; 33 : 2118-24.
8. Arnaoty A, Gouilleux-Gruart V, Casteret S, et al. Reliability of the nanospheres-DNA immunization technology to produce polyclonal antibodies directed against human neogenic proteins. *Mol Genet Genomics* 2013 ; 288 : 347-63.
9. Hraber P, Bradfute S, Clarke E, et al. Amphiphilic block copolymer delivery of a DNA vaccine against Zika virus. *Vaccine* 2018 ; 36 : 6911-7.
10. Lindsay KE, Bhosle SM, Zurla C, et al. Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET-CT and near-infrared imaging. *Nat Biomed Eng* 2019 ; 5 : 371-80.



**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

**Bulletin d'abonnement page 810
dans ce numéro de m/s**