

Université de Montréal

Utilisation des nanovecteurs chitosane-DIPEA-PEG/ARNm pour la thérapie génique non virale. Vers une nouvelle formulation de vaccins à ARNm

Par

Benabdoun Inès

Département de Pharmacologie et Physiologie, Institut de génie biomédical, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences appliquées (M. Sc.) en génie Biomédical

Octobre 2023

© Benabdoun Inès, 2023

Université de Montréal

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Utilisation des nanovecteurs chitosane-DIPEA-PEG/ARNm pour la thérapie génique non virale.
Vers une nouvelle formulation de vaccins à ARNm**

Présenté par

Benabdoun Inès

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alain Moreau

Président-rapporteur

Julio Fernandes

Directeur de recherche

Jonathan Perreault

Codirecteur

Tony Antakly

Membre du jury

Résumé

Suite à la pandémie de COVID-19, l'utilisation de l'ARNm en tant qu'agent thérapeutique s'est révélé prometteur pour la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, l'un des principaux défis à surmonter est la nécessité de préserver l'intégrité de l'ARNm contre la dégradation enzymatique qui peut entraver son efficacité thérapeutique.

L'utilisation du chitosane comme vecteur de livraison a engendré beaucoup d'intérêt dû à ses propriétés de biocompatibilité, biodégradation et de faible toxicité. Lorsqu'il est associé à l'ARNm, le chitosane forme des nanoparticules grâce à une interaction électrostatique entre la charge positive du chitosane et la charge négative de l'ARNm. Notre laboratoire a synthétisé un nanovecteur composé de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} avec des modifications incorporées sous forme d'ajout de groupes DIPEA et PEG. Ces modifications sont conçues pour augmenter la stabilité et prolonger la demi-vie des nanoparticules. Le but de notre projet est de développer une nouvelle nanoplateforme vaccinale basée sur l'utilisation de nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm qui permettra de protéger l'ARNm contre la dégradation enzymatique et à faciliter sa livraison à son site d'action *in vitro*.

Les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm ont été caractérisées par DLS pour mesurer la taille ainsi que le potentiel zêta. Ensuite, des essais ont été réalisés sur la complexation, l'encapsulation et la libération de l'ARNm du polymère CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}. Ces derniers ont montré une complexation totale à ratio N/P 3 :1 ainsi qu'une efficacité d'encapsulation de 95%. Par la suite, des évaluations de cytotoxicité ont été effectuées sur trois lignées cellulaires : les Caco-2, RAW 264.7 et HEKa. Les nanoparticules ont montré une viabilité cellulaire de $98.58 \pm 8.1\%$, $91.52 \pm 4.25\%$ et $97.65 \pm 4.3\%$ respectivement. Les essais de stabilité ont montré que ces nanoparticules étaient capables de protéger l'ARNm contre la dégradation par les RNases pendant une période allant jusqu'à 48h. Enfin, des études de transfection ont été confirmées par microscopie confocale. Nos nanoparticules ont montré une bonne capacité de protection ainsi qu'une efficacité d'internalisation dans les trois lignées cellulaires. Cependant, il n'a pas été possible d'observer l'expression protéique de la protéine EGFP correspondant à

l'ARNm utilisé. On suggère que c'est dû aux fortes interactions entre le chitosane et l'ARNm qui empêche sa libération une fois qu'il est internalisé. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pour améliorer les modifications apportées au vecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} afin de trouver un équilibre entre la protection de l'acide nucléique et sa libération.

Mots-clés : Thérapie génique, Chitosane, Nanoparticules, ARN messenger, Vaccination, Toxicité.

Abstract

Due to the COVID-19 pandemic, the use of mRNA as a therapeutic agent in fighting infectious illnesses has shown a great potential. However, one of the key hurdles to overcome is the requirement to protect mRNA against enzymatic degradation, which might impair its therapeutic efficacy.

Because of its biocompatibility, biodegradability, and low toxicity, the use of chitosan as a delivery vector has gained significant interest. When associated with mRNA, chitosan forms nanoparticles through electrostatic interaction between the positive charge of chitosan and the negative charge of mRNA. Our laboratory has synthesized a nanocarrier composed of CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} with incorporated modifications in the form of DIPEA and PEG groups. These modifications are intended to improve nanoparticle stability and lengthen their half life. Our project's objective is to create a novel vaccine nanoplatform based on the use of CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/mRNA nanoparticles that will protect mRNA from enzymatic degradation and enable its delivery to its *in vitro* location.

DLS was used to determine the size and zeta potential of the CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/mRNA nanoparticles. Following that, experiments on the complexation, encapsulation and release of mRNA from CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} were performed. These experiments showed full complexation at N/P ratio of 3:1 and an encapsulation efficiency of 95%. Following that, three cell lines were tested for cytotoxicity: Caco-2, RAW 264.7, and HEKa. The cell viability of nanoparticles was $98.58 \pm 8.1\%$, $91.52 \pm 4.25\%$ and $97.65 \pm 4.3\%$, respectively. Stability tests showed that these nanoparticles could protect mRNA from RNase degradation for up to 48 hours. Finally, transfection studies were confirmed by confocal microscopy. In all three cell lines, our nanoparticles showed good protection and internalization efficiency. However, it was not possible to observe the protein expression of the EGFP protein corresponding to the used mRNA.

It is suggested that this is due to strong interactions between chitosan and mRNA, preventing its release once internalized. As a result, more study is required to optimize the modifications made to the CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} vector in order to achieve a balance between nucleic acid protection and release.

Keywords: Gene Therapy, Chitosan, Nanoparticles, Messenger RNA, Vaccination, Toxicity.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xiii
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
1.1 Thérapie génique	1
1.2 Vaccination.....	2
1.2.1 Stimulation du système immunitaire lors de la vaccination.....	3
1.2.2 Vaccins conventionnels et vaccins à acides nucléiques.....	6
1.2.3 Applications des vaccins à ARNm.....	12
1.3 ARN messenger	18
1.3.1 Découverte.....	18
1.3.2 Structure et production.....	19
1.3.3 Stimulation immunitaire de l'ARNm	21
1.3.4 Approches pour améliorer la stabilité des ARNm vaccinaux.....	23
1.3.5 Barrière à l'administration	28
1.3.6 Voies d'administration	29
1.4 Stratégies de livraisons.....	33
1.4.1 Injection de l'ARNm nu	33
1.4.2 Vecteurs viraux.....	34
1.4.3 Vecteurs lipidiques.....	35
1.4.4 Vecteurs polymériques	36
1.4.5 Autres approches de livraison.....	38
1.5 Chitosane.....	40
1.5.1 Propriétés physico-chimiques du chitosane	40

1.5.2 Utilisation du chitosane dans la formation des nanoparticules à ARN	43
1.5.3 Stratégies pour améliorer la livraison des nanoparticules Chitosane- ARNm.....	44
1.6 Cytotoxicité	46
1.7 Internalisation et échappement endosomal.....	48
CHAPITRE 2 Objectif et hypothèses	51
2.1 Problématique et sujet d'étude	51
2.2 Hypothèses de recherche.....	51
2.3 Objectifs	52
CHAPITRE 3 MATERIELS ET MÉTHODES	53
3.1 Préparation des nanoparticules	53
3.2 Électrophorèse sur gel agarose	53
3.3 Détermination de la taille, du potentiel- ζ et de l'indice de	54
3.4 Efficacité d'encapsulation	54
3.5 Libération de l'ARNm des nanoparticules CH-DIPEA ₅₃ - PEG/ARNm	55
3.6 Quantification et analyse de l'intégrité de l'ARNm contre la	55
3.6.1 Amplification de l'ADN	56
3.6.2 Électrophorèse sur gel agarose	57
3.6.4 Électrophorèse sur gel polyacrylamide	58
3.6.5 Cinétique de dégradation de l'ARN dans les nanoparticules en présences d'RNase A	
3.7.1 Culture cellulaire	59
3.7.2 Décongélation et passage cellulaire.....	60
3.7.3 Viabilité et toxicité cellulaire.....	61
3.8 Internalisation des nanoparticules CH-DIPEA ₅₃ -	63
3.9 Analyse par microscopie confocale.....	64
3.10 Analyse statistique	65
CHAPITRE 4 RÉSULTATS	66
4.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules CH-.....	66
4.2 Libération de l'ARNm-EGFP des nanoparticules CH-DIPEA ₅₃ - PEG _{1,15} /ARNm-EGFP et stabilité contre la dégradation enzymatique	68
4.3 Viabilité cellulaire et toxicité.....	71

4.4	Internalisation des nanoparticules CH- DIPEA ₅₃ -PEG _{1.15}	74
CHAPITRE 5 DISCUSSION.....		81
5.1	Caractérisation physico-chimiques des nanoparticules	84
5.2	Toxicité des nanoformulations : la toxicité des nanoparticules CH-DIPEA ₅₃ -PEG _{1.15} est type cellulaire dépendante	89
5.3	Les nanoparticules CH-DIPEA ₅₃ -PEG _{1.15} /ARNm-EGFP	92
CHAPITRE 6 Conclusion et Perspective		96
Références bibliographiques.....		97

Liste des tableaux

Tableau 1. Études cliniques sur les vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses.15

Tableau 2. Séquences des amorces pour amplifier l'ADN.....56

Liste des figures

Figure 1. Stimulation du système immunitaire lors de la vaccination	6
Figure 2. Distinction entre les vaccins à ARNm non répliatif et auto-répliatif.....	11
Figure 3. Structure de l'ARNm mature.....	20
Figure 4. Schéma illustrant les diverses méthodes de délivrance de l'ARNm pour des applications vaccinales.	39
Figure 5. Structure chimique de la chitine et du chitosane	42
Figure 6. Représentation schématique des modifications apportées au chitosane ainsi que de la formulation de nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm	45
Figure 7. Plasmide pLacthiMONTetA-gfpuv.....	57
Figure 8. Caractérisation des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP	67
Figure 9. Libération de l'ARNm-EGFP des nanoparticules CH-DIPEA-PEG.	69
Figure 10. Évaluation de la résistance des nanoparticules contre la dégradation enzymatique.....	70
Figure 11. Viabilité cellulaire et toxicité des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP.	74
Figure 12. Transfection des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2), RAW macrophages 264.7 murins et kératinocytes épidermiques primaires (HEKa) avec les nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP-Cy5.	79
Figure 13. Localisation intracellulaire des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP-Cy5	80

Liste des sigles et abréviations

ADNp : ADN plasmidique

AlPcS2a : Phtalocyanine d'aluminium disulfonée

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

CH : Chitosane

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPP : Peptides cationiques pénétrants dans la cellule

DCs : Cellules dendritiques

DDA : Degré de déacétylation

DEAE : Diethylaminoéthyle

DOPE : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine

DOTMA : 1,2-di-O-octadécényle-3-triméthylammonium propane

DPC : Dendrimère phtalocyanine

dsRNA : ARN double brin

FDA: Food and Drug Administration

HA : Antigène hémagglutinine

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

IPV : Vaccin poliovirus inactivé

LBPA : Lysobisphosphatidique

LDH : Lactate déshydrogénase

Luc-RNA : Gène rapporteur luciférase

m1Ψ : N1-méthyl-pseudouridine

m5C : 5-méthylcytidine

m5U: 5-méthyluridine

m6A : N6-méthyladénosine

MDA-5 : Melanoma Differentiation Antigen 5

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium

MW : Poids moléculaire

NA : Neuraminidase

NTP : Ribonucléotides triphosphates

OPV : Poliomyélite

ORF : Cadre de lecture ouvert

OVA : Ovalbumine

PAMAM : Poly(amidoamine)

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns

pDAMA: Poly(N,N-diméthylacrylamide)

PEI : Polyéthylèneimine

PLGHMGA : Polymères de poly(acide lactique-co-acide glycolique-co acidehydroxyméthyl glycolique)

PLL : polylysine

prM-E : protéine de l'enveloppe et de la membrane

PRR: Pattern Recognition Receptors

PSMA : Antigène de la membrane de la prostate

RIG-I : Gène inductible par l'acide rétinoïque I

RLRs : RIG-Like Receptors

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

s2U: 2-thiouridine

SAP: Sweet Arrow Peptide

SARS-CoV-2

SFV : Semliki Forest Virus

siRNA : ARN interférant

sncRNAs : ARN non codants

ssRNA : ARNm simple brin

TAA : antigène associé aux tumeurs

TLRs : récepteurs transmembranaise

TPPPS 2a : méso-tétraphényl porphyrine disulfonate

TPPS4 : tétraporphine tétrasulfonatée

TT3 : N1, N3, N5-tris(3-(didodécylamino)propyl)benzène-1,3,5-tricarboxamide

UTR : Région non-traduite

VEE : Venezuelan Equine Encephalitis Virus

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPH : Virus du papillome humain

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise, en particulier mon directeur de recherche, Dr. Julio Fernandes. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour l'opportunité qu'il m'a offerte de poursuivre ma maîtrise dans son laboratoire. Dès le début, il m'a accordé d'excellents conseils et son attitude positive au sein du laboratoire a été une source d'inspiration constante, nous encourageant à donner le meilleur de nous-mêmes.

Un grand merci à mon co-directeur, le Dr. Jonathan Perreault, pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire à l'INRS. Sa générosité et sa bienveillance ont été d'une aide inestimable tout au long de mon parcours.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble de l'équipe de notre laboratoire, en commençant par le Dr. Mohammed Benderdour, malgré son emploi du temps chargé, il a généreusement pris le temps de me guider et de m'apporter son aide dans mon travail de recherche. Je souhaite également exprimer ma sincère reconnaissance envers Patricia, qui a été un soutien inestimable depuis le début de ma maîtrise. Grâce à elle j'ai pu réaliser des progrès significatifs. Aussi, Mahdi et Zahra avec qui j'ai eu des échanges constructifs qui m'ont constamment motivé. Leurs idées et leur encouragement ont été d'une grande valeur pour mon parcours.

Enfin, je remercie mes parents et mon frère, malgré la distance qui nous sépare, ils n'ont jamais cessé de me soutenir et de me motiver. Leur soutien a été un essentiel dans la poursuite de mes objectifs.

Chapitre 1 INTRODUCTION

1.1 Thérapie génique

La thérapie génique est une approche innovante qui vise à guérir ou prévenir des maladies (Rubanyi, 2001). Elle consiste à introduire des acides nucléiques tels que l'ADN plasmidique (ADNp), l'ARN messager (ARNm) ou l'ARN interférant (siRNA), dans les cellules (Liu, 2019 ; Youn et Chung, 2015). L'objectif principal est de corriger les anomalies génétiques, de produire des protéines thérapeutiques ou bien inactiver des gènes responsables de maladies (Xu et al., 2014).

Au début utilisé comme technique d'édition génétique, la thérapie génique vise à introduire de manière permanente un fragment d'ADN fonctionnel pour remplacer un gène dysfonctionnel (He et al., 2011). Par la suite, d'autres approches ont été développées, notamment l'injection directe d'ADN dans la cellule cible, ou il est ensuite transcrit et traduit en une protéine fonctionnelle (Kobelt et al., 2014). Cependant, cette méthode présente un inconvénient, à savoir le risque de mutation insertionnelle provoqué par l'internalisation de l'ADN exogène dans le noyau cellulaire (Baum et al., 2004). Une alternative à cette approche consiste à remplacer l'utilisation de l'ADN par l'ARNm. En effet, l'ARNm a seulement besoin d'être internalisé dans le cytosol de la cellule pour être traduit et exprimé en protéine fonctionnelle, évitant ainsi le risque de mutation insertionnelle (Tavernier et al., 2011).

L'utilisation de l'ARNm en thérapie génique rencontre un premier obstacle majeur lié à sa sensibilité à la dégradation enzymatique, ce qui limite sa capacité à être internalisé et atteindre le cytosol des cellules cibles (Tavernier et al., 2011). Pour surmonter cette limitation, l'utilisation de vecteurs non viraux tels que les nanovecteurs lipidiques ou polymériques a été étudiée (Gomes-da-Silva et al., 2012 ; Ojer et al., 2013). Le chitosane et ses dérivés se présentent comme une approche prometteuse en raison de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité, permettant la formation de polyplexes pour la livraison d'ARNm (Tiyaboonchai, 2013).

La pandémie de SARS-CoV-2 a accru l'intérêt pour l'utilisation de nanoparticules dans la livraison d'ARNm à des fins vaccinales (Jackson et al., 2020). Les avancées cliniques récentes ont mis en évidence le potentiel de la thérapie génique dans le traitement de maladies graves, ouvrant ainsi de nouvelles possibilités pour son utilisation dans le domaine médical (Dunbar et al., 2018).

1.2 Vaccination

Le concept de la vaccination remonte au XVe siècle, lorsque les Turcs et les Chinois ont développé une pratique visant à induire une immunité contre les infections présentes localement dans leur région (Sachdeva et Arora, 2022). L'une de ces techniques, appelée 'variolisation', impliquait l'inoculation de croûtes de pustules de la variole chez des personnes infectées dans des coupures de la peau de personnes non infectées (Banerji et al., 2023). Malgré les effets protecteurs constatés chez certains individus, cette technique induisait des symptômes graves et pouvant conduire jusqu'au décès des patients (Coolen, 2019). En 1796, Edward Jenner, un médecin anglais, a observé que les laitières qui avaient contracté la vaccine, un virus qui affecte principalement les bovins et qui peut se transmettre à l'homme, n'avaient pas été infectées par la variole (Belongia et Naleway, 2003). Il a alors émis l'hypothèse que l'inoculation de personnes avec des pustules de vaccine pouvaient les protéger contre la variole. Pour confirmer cette hypothèse, il a inoculé un liquide contenant des pustules de vaccine à un enfant, puis, quelques jours plus tard, il l'a intentionnellement infecté avec le virus de la variole. Comme anticipé, l'enfant n'a pas développé les symptômes de la variole. Cette expérience a permis à Edward Jenner d'être reconnu comme le pionnier de la vaccination à l'ère de la médecine moderne (Banerji et al., 2023).

En 1879, Louis Pasteur établit le concept de la vaccination en créant un vaccin vivant atténué grâce à ses recherches sur l'immunisation contre la cholera aviaire chez les poulets (Hajj Hussein et al., 2015). En 1884, il franchit une nouvelle étape en créant le premier vaccin atténué contre la rage. Par la suite plusieurs vaccins ont été développés contre la tuberculose, la rougeole et le tétanos (Hajj Hussein et al., 2015).

De nos jours, suite à l'émergence du SARS-CoV-2, le domaine de la vaccination a connu une révolution majeure qui a joué un rôle essentiel pour éradiquer la pandémie en réduisant le taux d'infections et de décès. Cependant, il reste encore des défis à relever dans le développement des vaccins pour prévenir les maladies graves comme le VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*), Zika et Ebola (Sachdeva et Arora, 2022).

1.2.1 Stimulation du système immunitaire lors de la vaccination

La vaccination a pour objectif d'induire une immunité active en administrant à une personne non immunisée un antigène, tel que des fragments de virus ou de bactéries atténuées ou inactivées (Kang et Compans, 2009). Cela permet à l'individu de développer des cellules immunitaires spécifiques ainsi qu'une immunité contre l'agent pathogène concerné (Stern et Markel, 2005). Le système immunitaire est responsable de cette protection et est composé d'organes, de tissus et de cellules qui travaillent en collaboration pour défendre l'organisme contre les agents pathogènes (Iwasaki et Medzhitov, 2015). Le système immunitaire comprend une immunité innée et immunité adaptative, et lors de la vaccination, ces deux types d'immunité travaillent de manière synergique pour induire une réponse immunitaire (Sayour et Mitchell, 2017).

Le système immunitaire innée, qui comprend des barrières physiques comme la peau et les muqueuses, joue un rôle important en tant que première ligne de défense lors de la vaccination (Pashine et al., 2005). Les cellules immunitaires phagocytaires, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, possèdent des récepteurs appelés PRR

(*Pattern Recognition Receptors*) qui sont capables de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes, appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Pulendran et Ahmed, 2006). Une fois ces pathogènes reconnus, les cellules phagocytaires libèrent des médiateurs inflammatoires tels que des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Ces substances attirent d'autres cellules circulantes, comme les éosinophiles, monocytes et les neutrophiles, qui aident à éliminer les agents pathogènes (Kang et Compans, 2009). Cela entraîne une réponse inflammatoire qui se manifeste souvent par des symptômes tels qu'une augmentation de la température corporelle, rougeur et douleur au site d'injection (Dempsey et al., 2003).

Une fois que les cellules présentatrices d'antigènes ont ingéré et dégradé le pathogène, elles migrent du site d'infection vers les ganglions lymphatiques ou elles subissent une maturation en présentant l'antigène à leur surface en conjonction avec les molécules du CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*), ainsi que les protéines de co-stimulation (CD80/CD86) (Figure 1). Cette présentation de l'antigène permet l'induction des réponses des cellules T et B, qui font partie de la réponse immunitaire adaptative (Newport et al., 2004).

L'induction de réponses efficaces des cellules B et T spécifiques de l'antigène nécessite leur activation par des cellules présentatrices d'antigènes spécifiques qui ingèrent les antigènes (Kumar et al., 2011). Parmi ces cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques sont connues pour avoir la capacité la plus puissante de fournir une activation spécifique de l'antigène ainsi que des signaux de costimulation aux cellules T naïves et aux cellules B également (Steinman, 2011). Pour qu'un vaccin soit efficace, il est essentiel de fournir suffisamment de signaux de danger aux cellules dendritiques grâce aux antigènes du vaccin et/ou aux adjuvants (Pasare et Medzhitov, 2004).

Dans le cas des antigènes viraux, les cellules présentatrices d'antigènes vont présenter ces antigènes sur le CMH de classe I, ce qui sera ensuite reconnu par les lymphocytes T CD8+ ou cytotoxiques, qui induiront l'apoptose des cellules infectées en sécrétant des perforines et des granzymes (Lang et al., 2012). En revanche, si l'antigène est une bactérie ou un pathogène parasitaire, les cellules présentatrices d'antigènes vont présenter les antigènes sur le CMH de classe II, qui seront identifiés par les lymphocytes T CD4+ (Weinberger et al., 2008). Les lymphocytes T CD4+ se différencieront ensuite en sous-populations spécifiques, telles que Th1, Th2, Th17, Tfh et Treg. Les cellules Tfh sont essentielles pour l'activation des lymphocytes B (Janeway et al., 2009). Une fois activées, ces cellules B se différencient en plasmocytes qui produisent des anticorps spécifiques à l'antigène, ainsi qu'en cellules B mémoire. Les lymphocytes B peuvent également être activés directement par un contact direct avec l'antigène (Lang et al., 2012).

L'immunité adaptative joue également un rôle crucial dans la création d'une mémoire immunologique. En effet, lorsque l'organisme est exposé à un antigène pour la deuxième fois, les lymphocytes B mémoires se multiplient et se différencient plus rapidement, ce qui conduit à une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace (Anaya et al., 2013). Cette capacité du système immunitaire à se souvenir et à réagir de manière spécifique lors d'une exposition ultérieure à l'antigène est ce qui rend les vaccins si efficaces dans la prévention des maladies infectieuses (Pashine et al., 2005). En stimulant la formation de cette mémoire immunitaire, les vaccins visent à induire une immunité protectrice à long terme contre les agents pathogènes (Kang et Compans, 2009).

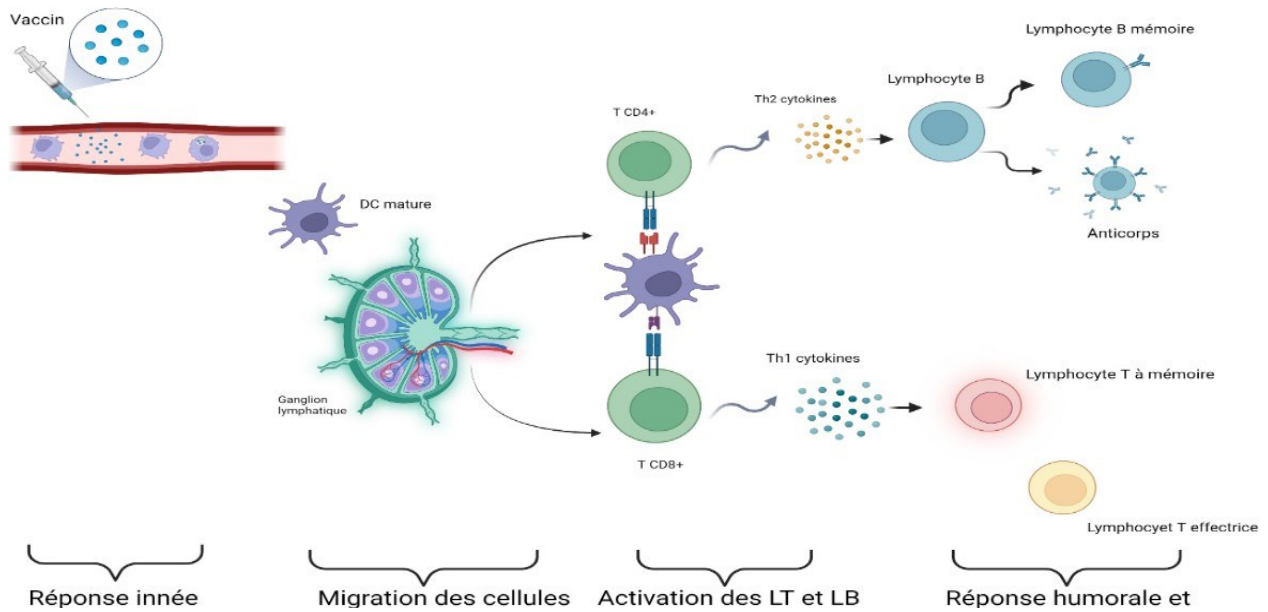


Figure 1. Stimulation du système immunitaire lors de la vaccination.

Après avoir phagocyté le pathogène, les cellules dendritiques se déplacent vers les ganglions lymphatiques, ou elles exposent le pathogène sur les molécules CMH I/CMH II, déclenchant l'activation des cellules B et T, engendrant une réponse immunitaire humorale ou cytotoxique.

Adaptée et modifiée de (Crommelin et al., 2013)

Image créée par BioRender.com

1.2.2 Vaccins conventionnels et vaccins à acides nucléiques

Pour qu'un vaccin soit considéré comme adéquat tout en offrant une immunisation efficace et en minimisant les effets secondaires observés, il doit répondre à plusieurs caractéristiques essentielles, notamment la sécurité, l'efficacité, le dosage approprié, une durée de protection adéquate, une administration pratique et un stockage approprié (Sachdeva et Arora, 2022).

Les vaccins conventionnels sont généralement classés en : vaccins atténués, vaccins inactivés, vaccins sous-unitaires et les protéines recombinantes (Banerji et al., 2023 ;

Sachdeva et Arora, 2022).

Les vaccins atténués, qui sont parmi les premiers vaccins développés suite aux découvertes de Jenner, sont des microorganismes qui ont perdu leur pouvoir pathogène mais qui sont capables de se répliquer dans un individu sain sans provoquer la maladie (Yadav et al., 2020). Un exemple de vaccin atténué est le vaccin oral contre la poliomyélite (OPV) (Minor, 2015). Cette atténuation est obtenue par des passages successifs du pathogène dans des tissus de culture, ce qui entraîne l'accumulation de mutations qui lui permet de ne pas causer la maladie chez les individus sains (Sachdeva et Arora, 2022). Cependant, ce type de vaccin présente des inconvénients comme le risque de reconversion vers une forme pathogène. De plus, ces vaccins ne peuvent pas être administrés chez certains individus comme les personnes immunodéprimées (Mak et al., 2013).

En raison du risque de reconversion des vaccins atténués vers leur forme pathogène, les chercheurs ont exploré la possibilité de développer des formes inactivées ou tuées des agents pathogènes (Dai et al., 2019). Parmi les vaccins inactivés actuellement disponibles, citons ceux contre la rage, la polio (IPV) et l'hépatite A (Stauffer et al., 2006). Le processus de fabrication de ces vaccins implique la destruction ou l'inactivation des microorganismes par la chaleur ou l'ajout de produits chimiques tels que le formaldéhyde (Sachdeva et Arora, 2022). Un avantage de ces vaccins est qu'ils n'ont pas besoin d'être conservés dans des températures basses, mais peuvent être lyophilisés et conservés (Dai et al., 2019). Cependant, ces vaccins présentent également un inconvénient, à savoir qu'ils ne peuvent pas générer une réponse immunitaire aussi forte. C'est pourquoi l'administration de plusieurs doses est nécessaire pour assurer une protection adéquate (Burrell et al., 2017 ; Sachdeva et Arora, 2022).

Suite à cette étape, une avancée majeure a été réalisée avec le développement des vaccins sous-unitaires. Ces vaccins se basent sur l'utilisation de fragments spécifiques d'antigènes du pathogène plutôt que de l'agent pathogène complet (Tsoras et Champion, 2019). Cette approche permet d'obtenir une meilleure réponse immunitaire tout en réduisant le risque de reversion vers une forme pathogène. Les vaccins contre l'influenza A et B ainsi que l'hépatite B sont des exemples de vaccins qui appartiennent à cette catégorie (Nwagwu et al., 2022).

Les vaccins recombinants se fondent sur les principes du génie génétique, impliquant l'insertion d'un fragment d'ADN spécifique du pathogène dans un vecteur, généralement exprimé dans une bactérie (Daniali et al., 2022). Une fois exprimé, l'antigène correspondant est purifié et formulé pour créer le vaccin. Le vaccin contre le VPH (*Virus du papillome humain*) est un exemple de vaccin recombinant (Burnette, 1991).

En plus de l'utilisation des vaccins conventionnels, une autre approche consiste au développement de vaccins à base d'acides nucléiques. Les vaccins à acides nucléiques comprennent les vaccins à ADN et les vaccins à ARNm (Gill et al., 2022). Les vaccins à ADN consistent à introduire dans la cellule hôte un plasmide qui contient le gène viral d'un pathogène d'intérêt (Prather et al., 2003). Une fois administré dans la cellule hôte, cet ADN pénètre dans le noyau cellulaire, où il est transcrit en ARNm puis traduit en une protéine antigénique (Restifo et al., 2000 ; Liu, 2019). Cela déclenche à la fois une réponse immunitaire humorale et cellulaire (Banerji et al., 2023).

Comparés aux vaccins conventionnels, ces vaccins à base d'acides nucléiques présentent certains avantages. Ils sont considérés comme plus sûrs car il n'y a pas de risque d'infections secondaires ou de pathogénicité (Qin et al., 2021). De plus, leur fabrication est relativement facile, ce qui permet une production rapide à grande échelle (Geall et al., 2013). Par exemple, le vaccin à ADN contre le virus SARS-CoV en 2003 a été produit en environ 20 mois, tandis que le vaccin contre le virus Zika a été développé en

seulement 3 mois en 2016 (Sachdeva et Arora, 2022). Cependant, ces types de vaccins présentent également des défis. L'un des principaux problèmes est la possibilité de mutations par insertion due à l'intégration de fragments d'ADN dans le génome de l'hôte, ce qui peut altérer l'activité des gènes adjacents (Bushman, 2020). De plus, la production d'anticorps dirigés contre l'ADN peut entraîner des maladies auto-immunes (Banerji et al., 2023).

Les vaccins à ARNm suivent le même principe, mais au lieu d'introduire de l'ADN, on introduit de l'ARNm synthétique dans la cellule cible (Huang et al., 2022). Une fois à l'intérieur, cet ARNm va imiter les fonctions de l'ARNm naturel en le traduisant en une protéine antigénique (Huang et al., 2022 ; Gill et al., 2022). Cela va ensuite stimuler une réponse immunitaire à la fois innée et adaptative (Föhse et al., 2021). Cette approche a suscité un intérêt majeur ces dernières années, en particulier avec l'émergence de la pandémie due au virus SARS-CoV-2. Cependant, il convient de noter que l'utilisation de cette approche n'est pas récente. En effet, la première tentative remonte à 1990, lorsque Wolff et al. (1990) ont réussi à introduire de l'ARNm transcrit par voie intramusculaire chez des souris, permettant ainsi l'expression de la protéine correspondante (Wolff et al., 1990). A l'époque, cette approche n'a pas suscité beaucoup d'intérêt en raison de l'instabilité, de la synthèse et la délivrance de la molécule d'ARN par rapport à celle de l'ADN (Dolgin, 2021).

La plateforme des vaccins à base d'ARNm se divise en deux catégories : les ARNm non répliatifs et les ARNm auto-répliatifs (Blakney et Geall, 2021). La distinction entre les deux réside dans la présence ou l'absence d'une machinerie de réplication virale (Kwon et al., 2022). Les ARNm auto-répliatifs utilisent souvent une machinerie dérivée des alphavirus, qui sont des virus à ARN à polarité positive (Lundstrom, 2018). Ces ARNm auto-répliatifs contiennent également plusieurs protéines non-structurales (NSP1-4) qui jouent un rôle clé dans la réplication et l'amplification de l'ARNm. En plus de cela, ils comprennent un promoteur subgénomique et le gène antigénique spécifique (Maruggi et al., 2021). Lorsqu'ils sont administrés, les ARNm auto-répliatifs pénètrent dans les

cellules cibles et utilisent leur propre machinerie pour se répliquer (Pascolo, 2005). Cela permet une augmentation significative de la production de la protéine antigénique. En conséquence, une plus grande quantité de protéine antigénique est exprimée, ce qui stimule une réponse immunitaire plus robuste (Gebre et al., 2021; Kwon et al., 2022). Les ARNm non répliquatifs, quant à eux, ont une structure plus simple. Ils sont composés d'une coiffe 7-méthyl guanosine 5 cap, d'une région 5'UTR (*Untranslated Region*), d'une séquence d'ARN codant pour la protéine antigénique, d'une région 3'UTR et d'une queue poly A à l'extrémité 3'. Ces ARNm sont de taille plus petite, d'environ 2 kb, et permettent la traduction spécifique de la protéine antigénique (Banerji et al., 2023).

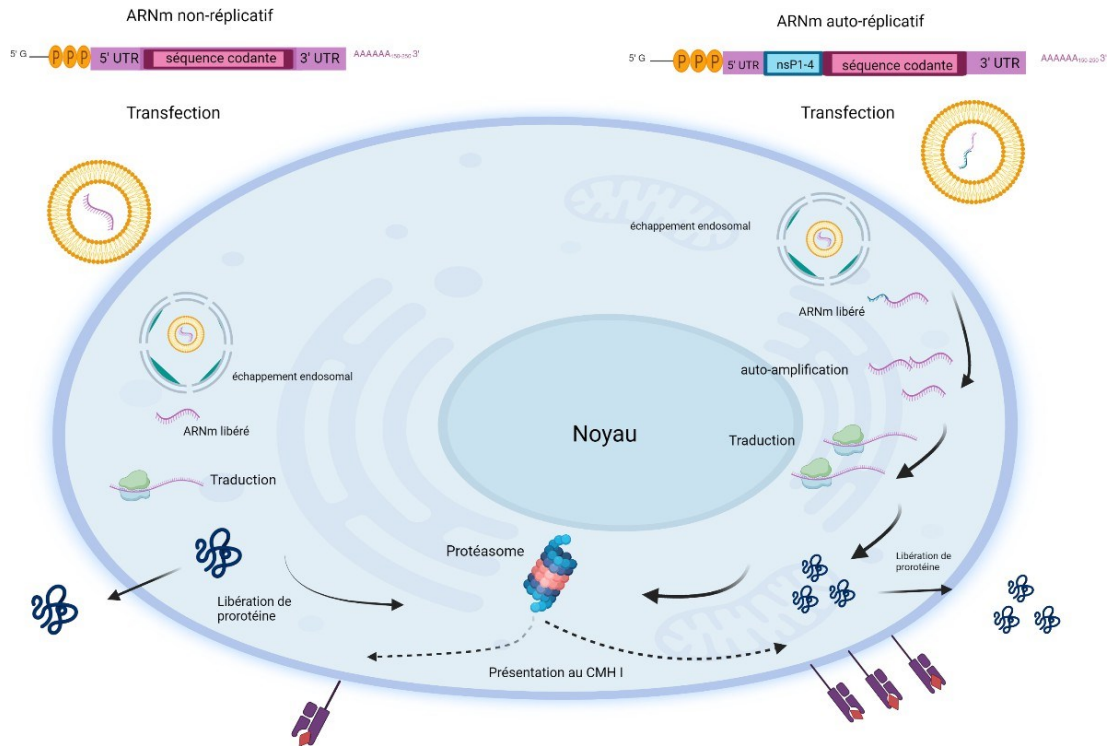


Figure 2. Distinction entre les vaccins à ARNm non réplcatif et auto-réplcatif, ainsi que le processus d'expression de l'antigène dans le vaccin à ARNm

Adaptée et modifiée de (Sandbrink et Shattock, 2020)

Image créée par BioRender.com

L'utilisation de l'ARNm pour les vaccins présente plusieurs avantages par rapport aux autres types de vaccins mentionnés précédemment. Tout d'abord, les ARNm agissent directement dans le cytoplasme de la cellule et ne s'intègrent pas dans le noyau cellulaire, ce qui réduit considérablement le risque de mutagenèse par insertion (Tombácz et al., 2021). De plus, les vaccins à ARNm sont considérés comme sûrs à utiliser (Ulmer et al., 2012). La méthode de fabrication repose sur une approche sans cellule, ce qui permet de réduire les risques de contamination. Cela est particulièrement avantageux pour développer des vaccins contre des agents pathogènes fortement mutés (Sachdeva et Arora, 2022).

1.2.3 Applications des vaccins à ARNm

Récemment, l'utilisation de la technologie des vaccins à ARNm a suscité un intérêt croissant dans le développement de vaccins à la fois prophylactiques, en prévention des infections par des agents pathogènes, et thérapeutiques, dans le but de traiter des maladies telles que le cancer chez les individus déjà atteints (Lee et al., 2018).

1.2.3.1 Maladies infectieuses

La première tentative de développer un vaccin à ARNm a été entreprise contre les virus de la grippe saisonnière (Lee et al., 2018). En 2001, Fleeton et al. (2001) ont démontré que l'ARNm auto-répliquatif offrait une protection contre le virus de la grippe A et induisait une réponse immunitaire chez les souris (Fleeton et al., 2001). Ce virus présente la particularité de modifier fréquemment ses antigènes hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA) (Lyons et Luring, 2018). Grâce aux avantages offerts par les vaccins à ARNm, il est possible de concevoir une combinaison d'antigènes appropriée dans le vaccin contre la grippe (Kieny et al., 2006). Après avoir injecté un ARNm codant pour la protéine HA complète du virus de la grippe, Petsch et al. (2012) ont constaté une protection déclenchée à la fois par les lymphocytes B et T dans des modèles *in vivo* de souris et furets (Petsch et al., 2012). Outre le vaccin contre la grippe A, de nombreux autres vaccins à ARNm ont été développés pour lutter contre divers agents pathogènes comme le virus Zika, le VIH, le virus respiratoire syncytial, le virus Ebola, le virus de la rage et le plasmodium (responsable du paludisme) (Chaudhary et al., 2021). Par exemple, des études ont montré que l'administration de nanoparticules lipidiques contenant un ARNm modifié en nucléosides codant pour l'antigène prM-E (*protéine de l'enveloppe et de la membrane*) lié au virus Zika, conduit à une protection et à la production d'anticorps neutralisants contre l'antigène prM-E chez des souris et des macaques rhésus (Pardi et al., 2017).

Cependant, la protéine d'enveloppe du VIH présente une diversité antigénique remarquable, rendant difficile la mise au point d'un vaccin efficace contre ce virus. Malgré cela, des études précliniques ont exploré des approches prometteuses. Par exemple, l'utilisation d'une nanoémulsion cationique encapsulant un ARNm autorépliquatif codant pour la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, administrée par voie intramusculaire chez des macaques rhésus, a démontré une réponse immunitaire humorale et cellulaire (Brito et al., 2014 ; Mascola, 2015). Une autre approche intéressante consiste à encapsuler des ARNm modifiés en nucléosides codant pour les chaînes légères et lourdes d'anticorps anti-VIH à large spectre (VRCO1) (Pardi et al., 2017 ; Singh, 2021). Des études ont montré que cette approche a été capable de neutraliser 98% des souches du VIH (Singh, 2021).

Depuis l'émergence du virus SARS-CoV-2 et la pandémie mondiale qui a bouleversé le monde en 2020, une véritable course à la création d'un vaccin contre ce virus a été lancée. Parmi les différentes catégories de vaccins, ceux à ARNm ont suscité un intérêt particulier en raison de leur méthode de développement sans utilisation de cellules et de leur fabrication rapide (Banerji et al., 2023).

En décembre 2020, la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis a approuvé l'utilisation du vaccin BNT162b2 chez l'humain, faisant ainsi de lui le premier vaccin à acide nucléique autorisé pour une utilisation chez l'être humain pour le virus SARS-CoV-2 (Knezevic et al., 2021). Ce vaccin est le fruit de la collaboration entre Pfizer et BioNtech, qui ont utilisé des nanoparticules lipidiques de la société *Acuitas Therapeutics* contenant de l'ARNm modifié par la pseudouridine N1-méthylée (Semple et al., 2022). Cet ARNm code pour la protéine spike du virus SARS-CoV-2 avec deux substitutions de la proline dans la sous-unité S2 (Walls et al., 2020). Au cours de la phase III des essais cliniques, le candidat BNT162b2 a démontré une efficacité entre 92.6 % et 95% (Polack et al., 2020 ; Wang, 2021).

Un autre candidat, le mRNA-1273, a également été approuvé par la FDA seulement une semaine après celui de Pfizer et BioNtech (Self et al., 2021 ; Chaudhary et al., 2021). En effet, Moderna, en collaboration avec l'Institut National des Allergies et des Maladies Infectieuses des États-Unis, a développé le vaccin mRNA-1273, qui utilise également des nanoparticules lipidiques encapsulant de l'ARNm modifié par la pseudouridine N1-méthylée (Corbett et al., 2020). Cet ARNm code pour la protéine spike du SARS-CoV-2 avec deux substitutions de proline. Lors des essais précliniques, ce candidat a également démontré une robuste activité neutralisante du virus ainsi qu'une réponse lymphocytaire T CD4+ et CD8+ (Chaudhary et al. 2021 ; Korosec et al., 2022).

Le principal défi pour ces deux candidats était le stockage. En effet, le mRNA-1273 peut être conservé entre 4 et 8°C pendant un mois, et seulement 12 heures à température ambiante, tandis que le BNT162b2 nécessite une température de -60°C. Ceci a rendu l'accès à ces vaccins difficile dans les régions où les infrastructures de stockage et de transport sont limitées (Chaudhary et al., 2021 ; Kis, 2022).

Tableau 1. Études cliniques sur les vaccins à ARNm contre les maladies infectieuses.

Adapté de (Chaudhary et al., 2021 ; Kwon et al., 2022)

Compagnie	Nom	Cible/Antigène	Type de vaccin	Phase d'essais cliniques
Moderna	mRNA-1893	Zika	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna	mRNA-1325	Zika	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna	mRNA-1345	RSV	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna/Merck	mRNA-1777	RSV	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna/Merck	mRNA-1172	RSV	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna	mRNA-1851	Influenza A (H7N9)	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna	mRNA-1440	Influenza A (H10N8)	mRNA-modifié-LNP	Phase I
Moderna	mRNA-1010	Influenza A (H1N1)	Non connu	Phase I/II
BioNTech/Pfizer	BNT162b2	Protéine Spike	mRNA-modifié-LNP	Phase III
BioNTech/Pfizer	BNT162a1	RBD de la protéine Spike	mRNA non modifié	Phase I/II
BioNTech/Pfizer	BNT162b1	RBD de la protéine Spike	mRNA-modifié-LNP	Phase I/III
Moderna	mRNA-1273.211	Protéine Spike	mRNA-modifié-LNP	Phase II
Moderna/NIAID	mRNA-1273	Protéine Spike	mRNA-modifié-LNP	Phase III

RSV : Virus respiratoire Syncytial ; LNP : Nanoparticules lipidiques ; NIAID : Institut National des Allergies et Maladies Infectieuses ; RBD : Domaine de liaison au récepteur

1.2.3.2 Immunothérapie

Les vaccins à ARNm sont de plus en plus étudiés à des fins thérapeutiques, notamment dans le traitement du cancer, suscitant un intérêt croissant (Rosenberg et al., 2004). De nombreuses études récentes se concentrent sur cette approche novatrice. Le but principal de ces vaccins est de focaliser leur action sur les cellules cancéreuses tout en évitant les cellules saines, ce qui présente un avantage significatif par rapport aux anciennes techniques utilisant des agents chimiothérapeutiques (Huang et al., 2014 ; Urruticoechea et al., 2010). En effet, ces derniers attaquent non seulement les cellules cancéreuses, mais aussi les cellules saines en division, telles que celles de la peau, des cheveux et des intestins, entraînant des effets secondaires indésirables (DeVita et Chu, 2008).

Cette approche est basée sur deux méthodes. La première est une approche *ex vivo*, où des cellules dendritiques sont prélevées à partir d'un échantillon biologique, généralement du sang du patient (Bonehill et al., 2008 ; Kranz et al., 2016). Ces cellules dendritiques agissent en tant que cellules présentatrices d'antigènes. Ensuite, l'ARNm, codant pour l'antigène associé aux tumeurs (TAA), pénètre dans ces cellules dendritiques à l'aide de techniques telles que l'électroporation, la micro-injection, ou l'utilisation de lipoplexes ou de polyplexes (Lee et al., 2018). Une fois à l'intérieure de la cellule, l'ARNm s'exprime en produisant la protéine d'intérêt, permettant aux cellules dendritiques de se différencier en cellules dendritiques matures (Manolova et al., 2009). Ces dernières expriment l'antigène sur leur CMH I et activent ainsi les lymphocytes T. Les antigènes exogènes peuvent également être exprimé sur le CMH I par un processus appelé présentation croisée, ce qui induit une réponse cytotoxique et entraîne la mort des cellules tumorales (Reddy et al., 2007).

En 2010, le vaccin autologue Sipuleucel-T a été le premier vaccin approuvé par la FDA pour le traitement du cancer de la prostate métastatique (Lee et al., 2018). Des essais sur des modèles de souris ont démontré une génération de réponse humorale et cytotoxique (GuhaThakurta et al., 2015). Par ailleurs, pour traiter le mélanome, des nanoparticules lipidiques encapsulant de l'ARNm codant pour différents TAAs ont été testées sur des patients d'un stade avancé de mélanome. Le vaccin Melanoma FixVac (BNT111) a démontré la génération d'une forte réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+ et CD4+ (Sahin et al., 2020).

La deuxième approche consiste à administrer l'ARNm *in vivo* principalement par voie intraveineuse (Kranz et al., 2016). Cependant l'ARNm non protégé est sensible à la dégradation enzymatique, ce qui nécessite l'utilisation de stratégies de livraison non virales, comme des vecteurs lipidiques et polymériques (voir section 1.4), pour cibler spécifiquement les cellules dendritiques et délivrer l'ARNm de manière efficace (Bachmann et al., 2010). Des études ont montré que les nanoparticules de petite taille jouent un rôle essentiel dans cette approche, car elles peuvent atteindre les organes lymphoïdes, notamment les ganglions lymphatiques, où résident les cellules dendritiques (Swartz et al., 1996). Une fois internalisées, les cellules dendritiques permettent la présentation croisée de l'antigène, ce qui entraîne l'activation des cellules lymphocytaires. Un exemple illustrant cette approche est un vaccin formulé par BioNTech, où des nanoparticules lipidiques synthétisées sont utilisées pour encapsuler un ARNm codant pour l'ovalbumine (OVA), un antigène du virus de la leucémie murine. Ce vaccin a été administré par voie intraveineuse et a démontré une réponse immunitaire importante, notamment une réponse des lymphocytes CD8 + (Lee et al., 2018).

1.3 ARN messenger

1.3.1 Découverte

En 1940, les expériences menées par le scientifique suédois Torbjörn Caspersson ont observé la nature nucléoprotéique des chromosomes, et que le cytoplasme était riche en acides ribonucléique qui est relatif à l'activité métabolique des cellules. (Caspersson et Schultz, 1939). Dans cette même période, Jean Brachet cherchait à comprendre le rôle des acides nucléiques dans le développement embryonnaire en les marquant au tritium pour le suivre dans la cellule (Brachet, 1942). Ses expériences ont démontré que la quantité d'ADN était proportionnelle à la division cellulaire, tandis que la quantité d'ARN était proportionnelle à l'activité synthétique. De plus, il a remarqué que l'ARN est synthétisé dans le noyau avant de migrer vers le cytoplasme (Brachet, 1942).

Un peu plus tard en 1953, le biologiste américain James Watson et le physicien britannique Francis Crick, publie un article dans la revue Nature où ils démontrent que la structure de l'ADN est à double hélice (Bansal, 2003). Cette découverte a permis d'expliquer comment se fait la transmission de l'information génétique d'une génération à une autre. Il stipule que cette information circule uniquement dans un sens unique, c'est à dire d'un acide nucléique à une protéine mais ne peut aller dans le sens inverse, c'est-à-dire d'une protéine à un acide nucléique (Crick, 1958).

En se basant sur les résultats déjà obtenus, François Jacob et Jacques Monod énoncent l'hypothèse qu'il existe un intermédiaire entre l'ADN et les protéines qu'ils nomment 'ARN messenger' (Horton, 2006).

1.3.2 Structure et production

Plusieurs types d'acide ribonucléiques ont été identifiés dans la cellule, dont chacun possède une fonction particulière : Les ARN de transferts (ARNt) délivrent les acides aminés spécifiques au ribosome pour la synthèse des protéines. Les ARN ribosomiaux (ARNr) constitue la partie catalytique des ribosomes. D'autres ARN non codants (sncRNAs) comme les miRNA, siRNA et snoRNAs jouent un rôle important dans la régulation transcriptomiques et protéomiques (Jacovetti et al., 2021). Enfin, l'ARNm qui est une copie complémentaire au brin codant de l'ADN et sera traduit pour former des protéines (Livingstone et al., 2010).

L'ARNm est une molécule polymérique anionique composée d'un enchainement de nucléotides (Minchin et Lodge, 2019). Chaque nucléotide comporte un groupement phosphate, un ribose et une base azotée (Schoenmaker et al., 2021). Le groupement phosphate rattache les nucléotides via un lien avec le carbone 5' du ribose d'un côté et le carbone 3' du ribose de l'autre coté (Figure 3). Les nucléotides sont liés par des liaisons phosphodiesters d'une façon à avoir une extrémité phosphoryle en 5' et une extrémité hydroxyle en 3' d'où le sens 5'→3' de la polymérisation (Schoenmaker et al., 2021).

Le processus par lequel l'information génétique est transférée de l'ADN à l'ARN et de l'ARN à la protéine passe par plusieurs étapes : D'abord, le gène sous forme d'ADN sera transcrit en ARN pré messenger à l'aide de l'ARN polymérase II. Ensuite, cet ARN subit des modifications post transcriptionnelles où il y aura l'addition d'une coiffe qui consiste en l'ajout d'un méthyle guanosine triphosphate à l'extrémité 5' de l'ARN ; l'épissage (excisions des introns) et l'addition d'une queue polyA à l'extrémité 3' qui le protège de l'attaque des exonucléases. Enfin, l'ARN mature quitte le noyau vers le cytoplasme où il sera traduit par le ribosome en une protéine fonctionnelle (Orphanides et Reinberg, 2002). De façon générale, l'ARNm est constitué d'une coiffe, d'une région non traduite (UTR) en 5' et 3', d'un cadre de lecture ouvert (*ORF*) codant pour la protéine et d'une queue polyA (figure 3).

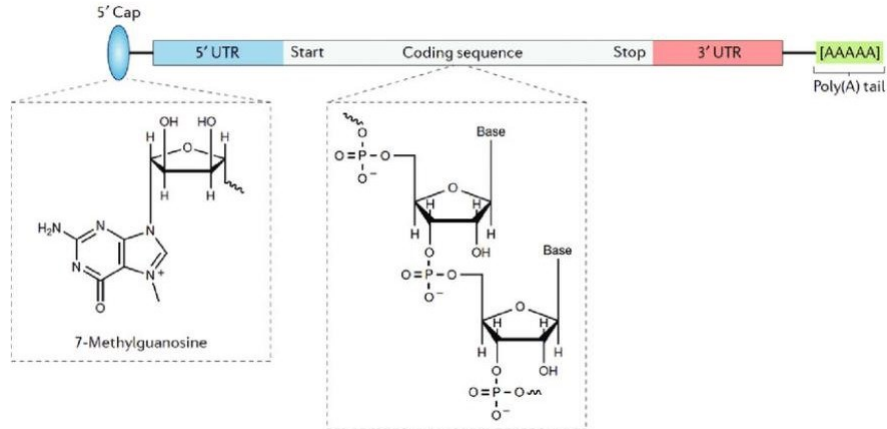


Figure 3. Structure de l'ARNm mature. Les principaux domaines structurels de l'ARNm sont le 5' cap, les régions non traduites en 5' et 3' (UTR), la séquence codante et la queue poly(A)

Adapté de (Patel et al., 2019).

La production des ARNm antigénique est réalisée dans un système sans cellule par transcription *in vitro* (IVT) à partir d'un ADNp. Ce dernier doit être conçu pour ressembler structurellement à l'ARNm mature présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. La réaction de transcription *in vitro* est réalisée à l'aide d'une ARN polymérase de type T7 ou Sp6, des ribonucléotides triphosphates (NTP), un tampon contenant du DTT (dithiothréitol) et des ions magnésiums (Sahin, 2014).

Avant de procéder à la réaction d'IVT, l'ADNp est linéarisée à l'aide d'enzyme de restriction afin d'éviter la formation d'ARNm circulaire. Ensuite, le coiffage de l'ARNm est effectué soit après la transcription à l'aide d'enzyme de coiffage recombinantes, soit pendant la réaction de transcription en ajoutant un analogue de coiffe synthétique. Quant à la queue poly(A), elle peut être codée dans l'ADN matrice, soit ajoutée enzymatiquement après la fin de la transcription (Coolen, 2019). Par la suite, l'ADNp est

dégradé à l'aide de DNases et l'ARNm est purifié par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou par précipitation afin d'éliminer les nucléotides non incorporés ainsi que les transcrits courts d'ARNm issus de la transcription abortive (Whisenand et Azizian, 2019). Une fois l'ARNm produit, il est stocké à une température de -80°C pour assurer sa stabilité.

Cette méthode de production présente divers avantages par rapport aux vaccins traditionnels. Tout d'abord, le délai de mise en place de nouveaux lots est considérablement réduit, car l'utilisation des cellules hôtes n'est plus nécessaire et les séquences d'antigènes peuvent être développées rapidement grâce aux techniques de bio-informatique. De plus, la production peut être réalisée dans des salles blanches conformes aux normes de bonne pratique (BPF ou GMP). En outre, les vaccins à ARNm peuvent être lyophilisés et stockés à température ambiante, ce qui simplifie la logistique et la distribution. Par conséquent, une meilleure couverture vaccinale peut être atteinte (Petsch et al., 2012 ; Jones, 2007).

1.3.3 Stimulation immunitaire de l'ARNm

Pour obtenir une efficacité maximale du vaccin, l'incorporation d'un adjuvant dans sa formulation est nécessaire pour induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale puissante (Coolen, 2019). Malgré sa forte similitude avec l'ARNm endogène, l'ARNm IVT présente une immunogénicité intrinsèque (Pardi et al., 2018). Il est reconnu par le système de l'immunité innée comme un pathogène grâce à des récepteurs spécifiques de reconnaissance de motifs appelés PRR (Devoldere et al., 2016). Deux grandes familles de PRRs sont impliquées dans la reconnaissance de l'ARNm IVT : les récepteurs transmembranaires TLRs (*Toll Like Receptors*) présents dans les endosomes et lysosomes et les récepteurs RLRs (*RIG-Like Receptors*) tels que le gène inducible par l'acide rétinoïque I (RIG-I) et MDA-5 (*Melanoma Differentiation Antigen 5*) présents dans le cytosol (Sahin et al., 2014).

La stimulation de ces PRRs active une cascade de réaction de signalisation, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type 1 (IFN). Ces médiateurs jouent un rôle essentiel dans l'activation de la réponse immunitaire (Desmet et Ishii, 2012).

Les récepteurs de type TLR3, TLR7 et TLR8, qui se trouvent dans les compartiments endosomaux des cellules de l'immunité innée, sont activés par l'ARNm IVT internalisé et induisent la sécrétion d'interféron. TLR3 reconnaît l'ARN double brin (dsRNA), tandis que TLR7 et TLR8 détectent l'ARNm simple brin (ssRNA) (Sahin et al., 2014). L'ARNm simple brin riche en uridine a été identifié comme un puissant inducteur d'interféron, principalement en stimulant TLR7 (Diebold et al., 2006). Bien que l'ARNm soit généralement reconnu comme un ssRNA, il peut contenir des structures secondaires en épingles à cheveux, qui forment des régions double brin et sont reconnus par les TLR3 (Karikó et al., 2004).

Une fois activés, les PRRs déclenchent une cascade de signalisation en utilisant des molécules adaptatrices spécifiques. Dans le cas des récepteurs TLR7 et 8, la signalisation est médiée par la protéine adaptatrice MyD88, qui conduit à l'activation des facteurs de transcriptions (AP1), nucléaire- κ B (NF κ B) et du facteur de régulation de l'interféron IRF7. Ces facteurs contribuent à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et à l'activation de cellules immunitaires (Devoldere et al., 2016). Quant aux récepteurs TLR3, ils activent la signalisation *via* la protéine TRIF (Protéine adaptatrice comportant un domaine TIR), ce qui entraîne l'activation du facteur NF- κ B et de la protéine TBK1 résultant en l'activation du facteur de régulation de l'interféron IRF3 et la production d'interféron de type 1, qui est essentiel pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Chen et al., 2017).

En plus des récepteurs de type TLRs, l'ARNm IVT peut également être détecté par les récepteurs de type RLRs, principalement RIG-1 (ou DDX58) et MDA5 (ou IFIH1) (Sahin et al., 2014). Le récepteur RIG-1 est principalement activé par de courts brins d'ARN double brin qui présentent un groupement triphosphate en position 5', c'est-à-dire qu'ils ne sont pas coiffés à l'extrémité 5'. En revanche, MDA5 est activé par de longs brins d'ARN double brin. Cette voie de signalisation est médiée par la protéine adaptatrice mitochondriale MAVS (ou ISP1), ce qui entraîne l'induction du facteur de transcription IRF3, conduisant ainsi à l'expression d'interféron de type 1 et de cytokines pro-inflammatoires (Pichlmair et al., 2006).

L'activation immunitaire de l'ARNm IVT présente des avantages et des inconvénients selon son utilisation thérapeutique. Dans le contexte d'une application vaccinale, cette activation est bénéfique car elle induit la production de cytokines, ce qui entraîne la maturation des cellules dendritiques et l'activation des lymphocytes T, renforçant ainsi la réponse immunitaire (Granot et Peer, 2017). Cependant, pour des applications non liées à l'immunothérapie, par exemple pour traiter des troubles génétiques impliquant une perte de fonction d'une protéine spécifique, l'ARNm peut subir une dégradation ou une traduction inefficace en raison de l'activation de voies de signalisation spécifiques (Granot et Peer, 2017). Par exemple, l'activation de la protéine kinase par le double brin ARN (PKR) peut entraîner l'inhibition de la traduction de l'ARNm, tandis que l'activation de l'oligoadénylate synthétase 2'-5' (OAS) peut entraîner la dégradation de l'ARNm par l'enzyme RNase L (Hovanessian, 2007).

1.3.4 Approches pour améliorer la stabilité des ARNm vaccinaux

Plusieurs modifications ont été réalisées pour modifier les éléments structuraux de l'ARNm afin d'améliorer sa stabilité et sa capacité de traduction (Sahin et al., 2014).

1.3.4.1 Modification de la coiffe en 5'

L'ARNm des cellules eucaryotes possèdent une structure spécifique à son extrémité 5', appelée coiffe, qui consiste en une 7-méthylguanosine (m7G) suivie d'une liaison triphosphate avec le premier nucléotide (m7GpppN) (Kim et al., 2021). Cette coiffe agit comme une protection contre les clivages par les exonucléases et permet la liaison avec le facteur de transcription EIF4E pour initier la traduction de l'ARNm (Li et al., 2022).

Deux approches sont couramment utilisées pour la coiffe de l'ARNm IVT. La première consiste à coiffer l'ARNm IVT après sa synthèse initiale en utilisant des enzymes recombinantes dérivées du virus de la vaccine (Venkatesan et al., 1980). La deuxième approche, plus fréquemment utilisée, consiste à ajouter un analogue de coiffe synthétique lors de la réaction de transcription *in vitro*. Cependant, il a été démontré que ces analogues de coiffe peuvent s'orienter facilement de manière inverse amenant la m7G vers les nucléotides 5' de l'ARNm via un phosphodiester 3'-5' (Li et al., 2022). Cette inversion réduit l'efficacité de la traduction. Afin de remédier à ce problème, des analogues de coiffe anti-inversion ARCA ont été développés. Ces ARCA sont obtenus en modifiant chimiquement la m7G, notamment en remplaçant le groupe 3'-OH par un groupe 3'-O-Me ou en substituant l'oxygène de la liaison triphosphate par du soufre, du borane ou du sélénium (Grudzien-Nogalska et al., 2007). Ces ARCA sont également résistants à l'hydrolyse par les enzymes de décoiffe (Dcp 1, Dcp 2 et DcpS), ce qui favorise la stabilité de l'ARNm (Qin et al., 2022).

1.3.4.2 Modification de la région 5' et 3' UTR

Les régions non traduites, qui sont des régions non codantes d'un ARN messager, jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Kim et al., 2021). Par exemple, la région non traduite en 5' située à l'extrémité 5' de tous les gènes codant pour des protéines est importante pour l'initiation de la traduction. De même, la région non traduite en 3', localisée en aval de la séquence codante, est impliquée dans des processus tels que le clivage, la stabilité et la polyadénylation des transcrits (Barrett et al., 2012).

Lors de la synthèse d'ARNm *in vitro*, les régions non traduites utilisées, appelées UTR, proviennent de plusieurs sources comme les globines α et β , les protéines de choc thermique humaines ou les virus (Li et al., 2022). Des études ont démontré que les UTR 5' et 3' de la β -globuline améliorent l'efficacité de la traduction (Lundstrom et al., 2018 ; Sahin et al., 2014). De même, les UTR 3' de l'ARNm du facteur d'élongation 1 α (EEE1A1) chez les eucaryotes et l'UTR 5' présente dans les ARNm des orthopoxvirus inhibent à la fois le décapping et la dégradation exonucléolytique 3'-5' (Sahin et al., 2014). De plus, la région 5'UTR de la protéine Hsp70 a été utilisée avec succès pour augmenter la traduction *in vitro* (Vivinus et al., 2001). Dans certaines applications thérapeutiques, il peut être nécessaire de produire des protéines pendant une durée limitée. A cet effet, des modifications sont apportées à la région 3'UTR en ajoutant des séquences riches en A et U, ce qui favorise une dégradation rapide de l'ARNm et permet une traduction restreinte dans le temps (Chen et Shyu, 1995).

1.3.4.3 Modification de la région codante

Dans le cas des vaccins à ARNm, la région codante est responsable de l'expression de l'antigène protéique cible (Li et al., 2022). Une des stratégies pour améliorer l'expression protéique consiste à optimiser les codons en remplaçant les codons rares de la séquence d'ARNm par des codons plus fréquemment utilisés dans l'organisme hôte (Cannarozzi et al., 2010). Cette substitution augmente la production de protéines

et améliore la vitesse d'élongation en favorisant l'utilisation d'ARNt identique, ce qui accélère le processus de traduction (Sahin et al., 2014).

Par ailleurs, les séquences 5' UTR qui se situe autour du codon initiateur dans l'ARNm peuvent être optimisées afin de faciliter une meilleure reconnaissance par le ribosome et une traduction plus efficace, ce qui permet d'augmenter la quantité de protéine produites (Liu, 2005 ; Kozak, 1986).

Une autre approche pour améliorer les propriétés thérapeutiques de l'ARNm consiste à incorporer des nucléotides naturellement modifiés telles que la 5-méthylcytidine (m5C), la N6-méthyladénosine (m6A), la 5-méthyluridine (m5U), la pseudouridine (Ψ) et la 2-thiouridine (s2U) lors de la post-transcription. Des études menées par Kariko et ses collègues ont démontré que l'incorporation de ces nucléotides modifiés peut réduire ou éliminer l'activation des récepteurs TLR3, TLR7 et TLR8, ce qui réduit l'immunogénicité de l'ARN *in vitro* (Devoldere, 2016). De plus, l'incorporation de nucléosides modifiés tels que la 2-thiouridine et la pseudouridine améliore la stabilité de l'ARNm en évitant sa reconnaissance par RIG-1 et PKR et favorise une traduction plus efficace (Nallagatla et Bevilacqua, 2008).

Des expériences menées par Kormann et ses collègues ont montré qu'après deux semaines d'injection d'ARNm modifié contenant 25% de 2-thiouridine et 25% de 5-méthylcytidine, le niveau de l'hormone EPO a augmenté par rapport au groupe témoin non traité (Kormann et al., 2011). De même, Pardi et al. (2017) ont administré des ARNm modifié avec de la N1-méthyl-pseudouridine (m1 Ψ) à l'aide de nanoparticules lipidiques (LNP), ce qui a entraîné la production d'anticorps contre le VIH-1 chez les souris traitées (Pardi et al., 2017).

Enfin, la purification de l'ARNm *in vitro* transcrit par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet d'éliminer les contaminants d'ARN double brin et réduire les propriétés immunostimulantes de l'ARNm (Karikó et al., 2011).

1.3.4.4 Modification de la queue poly(A)

La polyadénylation est la formation de queues d'adénine aux extrémités 3' des ARNm antigéniques. Cette queue joue un rôle important dans plusieurs processus, tels que le déplacement de l'ARNm mature vers le cytoplasme, l'efficacité de la traduction et la régulation de la durée de vie des ARNm (Park et al., 2016). La polyadénylation de l'ARNm IVT est réalisée soit en codant une queue poly(T) dans le modèle d'ADN plasmidique, soit par une réaction enzymatique en utilisant la poly(A) polymérase recombinante lors de la synthèse *in vitro* (Körner et Wahle, 1997). Pour des applications cliniques, il est plus avantageux de choisir la transcription de l'ARN à partir d'un modèle plasmidique, car cela permet d'obtenir une longueur de queue poly(A) prédéterminée (Kim et al., 2021).

Plusieurs études ont constaté qu'une longueur optimale de la queue poly(A) se situe entre 120 et 150 nucléotides ce qui favorise une meilleure traduction et expression protéique (Eckmann et al., 2011). Les transcrits ayant une queue poly(A) plus courte sont plus susceptibles à la dégradation enzymatique. En allongeant la queue poly(A), il est aussi possible de réduire le profil immunogène de l'ARNm IVT (Kim et al., 2021).

1.3.5 Barrière à l'administration

Pour que l'ARNm puisse exprimer la protéine d'intérêt, il doit faire face à plusieurs barrières extracellulaires et intracellulaires avant d'arriver dans le cytoplasme de la cellule cible (Wei et Hui, 2022). Les deux principales barrières extracellulaires sont (1) la charge négative de la membrane cellulaire (- 80mV) qui est maintenue par les phospholipides zwitterioniques, les pompes et les canaux ioniques, ce qui rend difficile l'internalisation de l'ARNm dans la cellule dû à la répulsion électrostatique entre l'ARNm et la membrane cellulaire (Kowalski, 2019). (2) La dégradation enzymatique par les exonucléases présentes dans la peau et le sang qui digèrent l'ARNm avant son entrée dans la cellule (Jerjes et al., 2020). Pour faire face à ces problématiques, plusieurs systèmes de livraisons ont été développés afin de protéger l'ARNm contre la dégradation enzymatique et l'aider à pénétrer dans la cellule. Ces vecteurs de livraison peuvent être viraux, chimiques ou physiques (Yin et al., 2014).

Les barrières intracellulaires comprennent l'échappement des endosomes, des récepteurs TLR et des endonucléases. En effet, quand l'ARNm encapsulé rencontre la membrane plasmique il sera enveloppé par une vésicule d'internalisation, par la suite ces vésicules vont fusionner avec les endosomes précoces (pH-6.5) et mûrir en endosome tardif (pH-5.5) et enfin en lysosome (pH-4.5) (Etienne jeandupeux, 2018 ; Hu et Wang, 2015). Afin d'échapper à la dégradation causée par le faible pH, l'ARNm encapsulé doit s'échapper des endosomes/lysosomes. Dans le cas des nanoparticules polymériques, la libération endosomale est mise en évidence par l'hypothèse de l'éponge à proton (*Proton-sponge hypothesis*). En bref, lorsque l'endosome atteint sa phase de maturation, celui-ci pompe des protons grâce à une pompe H⁺ ATPase. Les nanoparticules qui se trouvent dans l'endosome vont lier les protons aux groupes amines qui constituent le polymère. La liaison proton H⁺/groupes amines empêche l'acidification de l'endosome ce qui va permettre à la pompe de continuer de diffuser des protons ainsi que des ions vers sa lumière ce qui va augmenter l'osmolarité au sein de l'endosome. Par conséquent, l'eau va entrer dans l'endosome ce qui va générer une

pression osmotique qui entraîne l'éclatement du compartiment endosomal avec libération de son contenu dans le cytosol (Bus et Schubert, 2018).

Après l'échappement endosomal, la reconnaissance de l'ARNm par les récepteurs transmembranaires TLR représente le second obstacle à contourner lors de l'administration (Wang et al., 2021). Les ARN simple brin interagissent essentiellement avec les récepteurs TLR7 /8. Ces récepteurs vont induire l'activation de la voie MyD88 (Hoebe et Beutler, 2004).

1.3.6 Voies d'administration

Le choix des stratégies de délivrance des vaccins à ARNm revêt une importance majeure, car cela peut avoir un impact direct sur l'efficacité et la sécurité du vaccin (Pardi et al., 2018). Plusieurs voies d'administration sont disponibles, parmi lesquelles les plus couramment utilisées comprennent l'administration intradermique, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire et orale (Verbeke et al., 2019). Par ailleurs, des approches moins conventionnelles ont également été étudiées, telles que l'administration intranodale, intranasal et intravaginal (Joe et al., 2019 ; Lorenzi et al., 2010 ; Lindsay et al., 2020). Le choix de la voie d'administration est généralement effectué en tenant compte des propriétés physiologiques du site de vaccination et aussi du type de nanovecteur utilisé pour délivrer l'ARNm (Zeng et al., 2020).

1.3.6.1 Administration sous-cutanée et intradermique

La peau est composée principalement de trois grandes couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Hettinga et Carlisle, 2020). Lors de l'administration des vaccins à ARNm par voie sous-cutanée, ils sont généralement injectés dans la couche sous-cutanée, juste sous l'épiderme et le derme (Ibrahim, 2010). Cette région est constituée d'un réseau de tissu adipeux et contient peu de cellules immunitaires, mais elle abrite de nombreux kératinocytes qui sont des cellules épithéliales spécialisées et représentent 95% de sa

composition (Chenthamara et al., 2019). Lors de l'administration des vaccins, ceux-ci ont la capacité d'activer les PRRs présents dans les cellules immunitaires tels que les macrophages, ainsi que dans les cellules stromales comme les kératinocytes. Ces cellules peuvent ensuite agir comme des cellules présentatrices d'antigènes et induire une réponse immunitaire (Black et al., 2007).

Une étude réalisée par Pollard et al. (2013) a montré que l'administration sous-cutanée d'une nanoformulation d'ARNm codant pour l'antigène Gag du VIH-1, complexée avec DOTAP/DOPE, a permis de générer des réponses spécifiques aux antigènes, entraînant la destruction ciblée de cellules exprimant des peptides Gag et l'induction de réponses humorales (Pollard et al., 2013). En revanche, l'administration intradermique consiste à injecter le vaccin à ARNm dans la partie du derme de la peau, où plusieurs vaisseaux lymphatiques et sanguins sont présents. De cette manière, l'ARNm peut être capturé par les cellules présentatrices d'antigènes et être transporté vers les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes T et B (Kashem et al., 2017). Cette méthode d'administration a été évaluée lors d'essais cliniques menés par Alberer et al. (2017) sur des patients âgés entre 18 et 40 ans. Ils ont comparé l'administration intradermique d'un vaccin à ARNm codant pour la glycoprotéine du virus de la rage (CV7201) avec l'administration intramusculaire du même vaccin. Cette étude a démontré que l'administration intradermique à l'aide d'un dispositif sans aiguille induisait une meilleure réponse immunitaire que l'administration intramusculaire (Alberer et al., 2017).

1.3.6.2 Administration intraveineuse

L'administration intraveineuse des vaccins à ARNm permet une injection directe du vaccin dans la circulation sanguine (Diehl et al., 2001). Le principal avantage de cette voie d'administration est la production accrue de protéines par rapport aux autres méthodes (Pardi et al., 2015). Lorsque l'ARNm est administré par voie intraveineuse, les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques captent rapidement l'ARNm et le traduisent en protéines, stimulant ainsi la réponse immunitaire. Des études utilisant une nanoformulation d'ARN lipopolyplexe codant pour le gène rapporteur luciférase (Luc-RNA) ont montré une internalisation efficace des nanoparticules et une expression réussie de la protéine dans les cellules dendritiques (DCs) (Kranz et al., 2016). La biodistribution et l'accessibilité de l'ARNm à différentes cellules immunitaires constituent à la fois un avantage et un inconvénient. En effet, cela permet au vaccin d'atteindre divers organes, mais peut également induire une réponse immunitaire non spécifique en ciblant des cellules non désirées (Phua et al., 2013; Pardi et al., 2015; Kranz et al., 2016). Un autre inconvénient de cette approche réside dans la vulnérabilité de l'ARNm à la dégradation enzymatique dans la circulation sanguine, ce qui justifie la nécessité de l'encapsuler dans des nanovecteurs (Reichmuth et al., 2016). Des études ont démontré que l'encapsulation de l'ARNm avec des particules lipidiques et son administration par voie systémique permettent de le protéger de la dégradation enzymatique tout en induisant une réponse cytotoxique puissante (Broos et al., 2016; Reichmuth et al., 2016).

1.3.6.3 Administration orale

En comparaison avec les autres méthodes, l'administration orale est privilégiée en raison de ses multiples avantages (Eek et al., 2016). En utilisant cette voie, les vaccins peuvent induire des réponses immunitaires systémiques (Coffey et al., 2021). En effet, la muqueuse intestinale facilite le transport des pathogènes vers les barrières muqueuses et les présente aux cellules immunitaires. De plus, l'administration orale permet d'éviter les inconvénients liés aux injections par aiguille, tels que la douleur et les réactions indésirables (Coffey et al., 2021; Chenthamara et al., 2019).

Le premier vaccin oral a été développé en 1950 par Hilary Koprowski et Albert Sabin pour lutter contre le poliovirus (Davitt et Lavelle, 2015). Depuis, plusieurs vaccins destinés à l'administration orale ont été développés, notamment pour les gastro-entérites et les maladies respiratoires aiguës (Ramirez et al., 2017). Cependant, cette voie d'administration présente des défis particuliers pour les vaccins à base d'acides nucléiques, car ces derniers sont hautement sensibles à la dégradation enzymatique, ce qui rend difficile d'obtenir une réponse immunitaire adéquate au niveau du tractus gastro-intestinal (Zhang et al., 2019). Pour surmonter cela, différents types de nanovecteurs polymériques, lipidiques ou inorganiques ont été utilisés pour encapsuler l'ARNm et le protéger de la dégradation enzymatique (Ensign et al., 2012). Les nanovecteurs polymériques, tels que le PEI et le chitosan sont particulièrement utilisés, le chitosan présente des propriétés mucoadhésives et augmente la perméabilité muqueuse en ouvrant les jonctions épithéliales (Yeh et al., 2011). Une étude a démontré que l'utilisation de nanoparticules à base de polymère hybride ramifié poly (B-amino ester) encapsulant l'ARNm codant pour la protéine EGFP a permis d'obtenir une transfection réussie et une expression protéique d'EGFP dans les cellules Caco-2 *in vitro* (Abramson et al., 2022). Dans une autre étude menée par Sung et al. (2022) l'administration orale de nanoparticules lipidiques contenant de l'ARNm codant pour l'IL22 a été réalisée pour traiter l'ulcère colique chez des souris atteintes de colite aigüe (Sung et al., 2022). Cette approche a entraîné une réduction significative de

l'inflammation et une récupération des souris traitées. Malgré ces avancées, peu de vaccins à base d'acides nucléiques destinés à l'administration orale ont été traduits en phase clinique jusqu'à présent (Coffey et al., 2021).

1.4 Stratégies de livraisons

Plusieurs méthodes ont été élaborées pour transporter l'ARNm thérapeutique vers sa cible d'intérêt, favorisant ainsi son internalisation dans les cellules tout en le protégeant de la dégradation enzymatique. Ces approches sont principalement divisées en méthodes physiques telles que l'électroporation et le 'gene gun', ainsi qu'en l'utilisation de nanovecteurs de différentes natures : polymériques, lipidiques, viraux et peptidiques. En outre, des stratégies de délivrance d'ARNm nu, ainsi que des approches basées sur l'utilisation de cellules dendritiques, ont également été développées (Benteyn et al., 2015; Edwards et al., 2017). Dans cette section, nous nous concentrons principalement sur la délivrance d'ARNm sous sa forme libre et sur l'utilisation de vecteurs polymériques, lipidiques, viraux et peptidiques.

1.4.1 Injection de l'ARNm nu

Dans les premiers essais de vaccination, Wolff et al. (1990) ont mis en évidence la possibilité d'utiliser de l'ARNm nu et ont réussi à l'introduire *in vivo* par injection intramusculaire chez des modèles de souris, conduisant ainsi à une réponse immunitaire (Wolff et al., 1990). Pour administrer l'ARNm non encapsulé, il est dissout dans un tampon, les solutions de Ringer et de lactate de Ringer étant parmi les plus couramment utilisées car elles contiennent du calcium, supposé faciliter l'internalisation de l'ARNm par une voie dépendante du calcium (Ringer, 1882 ; Hartmann et Senn, 1932). Cette approche a été utilisée dans des essais cliniques ciblant le mélanome et la grippe A, et a entraîné des réponses immunitaires contre les antigènes respectifs (Edwards et al., 2017). Malgré l'efficacité observée dans certains essais cliniques, l'ARNm est une macromolécule polyanionique, ce qui rend difficile sa pénétration à travers la

membrane plasmique, elle-même de charge négative. Ainsi, le mécanisme précis de son internalisation n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été émises, suggérant que l'internalisation de l'ARNm pourrait se faire principalement par micropinocytose ou en utilisant la pression hydrostatique liée à la vitesse d'injection (Selmi et al., 2016 ; Stewart et al., 2018). Un des inconvénients majeurs de l'utilisation de l'ARNm seul est sa susceptibilité à la dégradation par les RNases, entraînant une demi-vie intracellulaire très faible, ce qui nécessite l'injection de doses élevées (Canton, 2018). Pour pallier cela, l'utilisation de vecteurs de livraison a été proposée pour protéger et stabiliser l'ARNm, améliorant ainsi son efficacité et sa durée de vie dans les cellules cibles.

1.4.2 Vecteurs viraux

Les virus sont largement utilisés en thérapie génique. Ces virus subissent généralement des modifications génétiques ou leur gènes viraux sont remplacés par l'ADN/ARN thérapeutique, qui doit être acheminé jusqu'au noyau cellulaire (Lundstrom, 2018). Parmi les virus utilisés pour administrer l'ARNm, ceux à brin positif sont privilégiés, car leur génome peut être traduit directement en protéines par le ribosome de l'hôte, minimisant ainsi le risque d'insertion dans le génome et de provoquer des mutations (Wadhwa et al., 2020). Certains exemples de tels virus comprennent les alphavirus, les flavivirus et les picornavirus (Ehrengruber et al., 2011 ; Rozovics et al., 2012). Avant leur utilisation, des modifications sont apportées au virus sauvage pour réduire sa virulence et le rendre incapable de se répliquer dans la cellule hôte (Lundstrom, 2019). Dans le cadre de la génération de vaccins, les vecteurs à base d'alphavirus tels que SFV (*Semliki Forest Virus*) et VEE (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus*) ont été utilisés (Yamamoto et al., 2009). Par exemple, le virus de VEE a été utilisé pour l'immunothérapie spécifique de PSMA (*Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen*) (Lundstrom, 2009). En effet, ce virus a été utilisé pour transporter l'antigène PSMA aux cellules immunitaires, ce qui a entraîné une réponse immunitaire des cellules T et des cellules B chez les souris vaccinées avec

seulement une dose du vaccin VEE-PSMA (Durso et al., 2007).

Cependant, l'utilisation de vecteurs viraux présente des inconvénients majeurs, tels que la probabilité d'induire des mutations dans le génome de l'hôte, leur immunogénicité et aussi la limitation de la taille de l'ADN/ARN pouvant être insérée dans le virus (Ramamoorth et Narvekar, 2015). Ces facteurs ont incité les chercheurs à explorer d'autres alternatives, telles que l'utilisation des vecteurs polymériques, lipidiques ou peptidiques.

1.4.3 Vecteurs lipidiques

Les nanovecteurs lipidiques occupent une place prépondérante dans la thérapie génique non virale et la vaccination à base d'ARNm (Kowalski et al., 2019). Les lipoplexes, résultant de l'association de lipides cationiques avec des acides nucléiques chargés négativement, se transforment en complexe de type liposome (lipoplexe) possédant une couche phospholipidique, une tête polaire hydrophile et une queue polaire hydrophobe, entourant un noyau aqueux (Hajj et al., 2017). Parmi les lipides cationiques les plus utilisés figurent DOTMA (1,2-di-O-octadécényle-3-triméthylammonium propane), le DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine) et le N1, N3, N5- tris(3-(didodécylamino)propyl)benzène-1,3,5-tricarboxamide (TT3). (Lu et al., 2007 ; Zohra et al., 2007 ; Michanek et al., 2010 ; Du et al., 2014). Le principal avantage de ces nanovecteurs réside dans leur capacité à être chargés positivement à un pH spécifique, facilitant ainsi l'encapsulation de l'ARNm et son association avec la membrane cellulaire (Pardi et al., 2015). Lors du processus d'échappement endosomal ces nanoparticules lipidiques peuvent également interagir avec les lipides anioniques de la membrane endosomale pour former des structures perturbatrices non-bicouche qui vont perturber l'organisation de la bicouche lipidique, libérant ainsi l'ARNm encapsulé dans le cytosol (Kowalski et al., 2019). Cependant, des essais *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence que ces nanoparticules lipidiques peuvent être fortement immunogènes et toxiques,

pouvant induire une réponse inflammatoire (Granot et Peer, 2017). Lors d'application vaccinales, l'utilisation du TT3 a été étudiée pour administrer le domaine de liaison au récepteur du virus SARS-CoV-2 par injection intramusculaire, ce qui a entraîné l'expression de l'antigène dans le tissu musculaire (Zeng et al., 2020). Par ailleurs, la société *Moderna Therapeutics* a réussi à protéger efficacement les souris contre l'infection par le virus Zika en injectant des nanoparticules lipidiques contenant de l'ARNm modifié codant pour le gène prM-E (Richner et al., 2017).

1.4.4 Vecteurs polymériques

Les polymères tels que les polyamines, dendrimères et nanomicelles offrent une approche alternative pour le transport des ARNm, même si leur développement est moins avancé que celui des lipides cationiques (Kowalski et al., 2019). La formation de nanoparticules à partir de polymères cationiques est similaire à celle des lipides cationiques. Ces polymères chargés positivement s'associent aux acides nucléiques chargés négativement par des interactions électrostatiques, créant ainsi des nanoparticules de diverses tailles, formes et charges (Kowalski et al., 2019). Ces nanoparticules peuvent ensuite être internalisées dans les cellules hôtes par endocytose, protégeant ainsi l'ARNm de la dégradation enzymatique. De plus, ces polymères présentent une biodégradabilité élevée et une faible toxicité pour les cellules hôtes (Lungwitz et al., 2005).

Parmi les polymères testés pour la livraison de l'ARNm transcrit *in vitro*, le Diethylaminoethyl (DEAE) dextran a été le premier (Koch, 1973). Cependant, aujourd'hui, le PEI et ses dérivés sont les polymères les plus couramment utilisés pour la délivrance des acides nucléiques (Lungwitz et al., 2005 ; de Ilarduya et al., 2010). Notamment, le PEI, connu pour son utilisation comme agent de transfection, comme le JetPEI de Polyplus Transfection, a été utilisé avec succès pour la livraison d'ARNm. Des études ont montré qu'en conjuguant le PEI de 2 kDa avec la cyclodextrine pour faciliter

l'encapsulation de l'ARNm et réduire la toxicité du polymère, il était possible de délivrer efficacement des vaccins à base d'ARNm (de Ilarduya et al., 2010). Cependant, le PEI présente également des problèmes de toxicité dus à son poids moléculaire élevé (> 25 kDa), à la présence résiduelle de PEI libre après la formation de nanoparticules, ainsi qu'aux interactions avec des protéines sériques chargées négativement, entraînant des agrégats qui réduisent l'efficacité de la transfection (Yu et al., 2016).

Des études ont montré que l'ARNm codant pour le gp 120 du VIH pouvait être délivré avec succès par voie intranasale en utilisant des nanoparticules de PEI (Li et al., 2017). De même, une réponse immunitaire humorale et cellulaire contre le virus de la grippe a été induite après une administration sous-cutanée de nanoparticules de PEI contenant de l'histidine pour encapsuler l'ARNm codant pour l'hémagglutinine de la grippe (Bertrand et al., 2011 ; Vogel et al., 2018).

En dehors des polymères synthétiques, le chitosane est le premier choix parmi les polymères naturels pour la délivrance des acides nucléiques en raison de sa biocompatibilité inhérente. Pour améliorer sa stabilité, il est souvent combiné avec d'autres polymères tels que le PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) un polymère anionique également utilisé pour la délivrance de vaccins à ARNm (Yasar et al., 2018). L'utilisation du chitosane pour encapsuler l'ARNm codant pour l'hémagglutinine et la nucléoprotéine du virus de la grippe a permis d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire après une administration sous-cutanée (McCullough et al., 2014).

Dans l'ensemble, l'utilisation des polymères comme vecteur de livraison des acides nucléiques a montré des effets thérapeutiques prometteurs dans des études précliniques, bien qu'ils ne soient pas aussi avancés cliniquement que les vecteurs lipidiques. Néanmoins, les vecteurs polymériques ont montré un potentiel considérable, et des recherches supplémentaires sont en cours pour permettre une traduction clinique des vaccins à ARNm basés sur ces polymères (Kowalski et al., 2019).

1.4.5 Autres approches de livraison

En plus des vecteurs viraux, lipidiques et polymériques, d'autres approches de livraison ont été développées, telles que la livraison basée sur les peptides et les nanoémulsions cationiques. Les peptides cationiques, composés de résidus d'arginine et de lysine, sont capables d'interagir électrostatiquement avec les molécules d'ARNm chargées négativement, formant ainsi des nanocomplexes de différentes formes, tailles et charge (Grau et al., 2018; Qiu et al., 2019). Un peptide cationique couramment utilisé dans les premières phases de développement de vaccins à ARNm est la protamine. Cette molécule présente des propriétés intéressantes pour faciliter la livraison de l'ARNm (Sköld et al., 2015). Elle joue un rôle protecteur en empêchant la dégradation enzymatique de l'ARNm et peut également servir d'adjuvant (Hoerr et al., 2000; Fotin-Mleczek et al., 2011). Des études ont démontré que la protamine a été efficacement utilisée pour maintenir l'efficacité de l'ARNm codant pour la glycoprotéine du virus de la rage lorsqu'il est soumis à des conditions de température extrêmes sur une longue période de stockage (Stitz et al., 2017). Il est également supposé que la complexation de l'ARNm avec la protamine peut activer le TLR7, en raison de sa similitude structurelle avec l'ARN viral (Fotin-Mleczek et al., 2011). Cependant, il est important de noter que la traduction efficace de l'ARNm dans la cellule hôte lorsqu'il est complexé avec la protamine est relativement faible, ce qui a limité son utilisation en tant qu'adjuvant seulement (Scheel et al., 2005). Ensuite, les peptides cationiques pénétrants dans la cellule (CPP), tels que RALA, contenant des répétitions de motifs arginine-alanine-leucine-alanine, ont également montré un intérêt dans la délivrance efficace de l'ARNm dans les cellules dendritiques, induisant ainsi une réponse cellulaire (Lacroix et al., 2020; McCarthy et al., 2014). Des exemples de produits commerciaux basés sur des peptides pénétrants dans la cellule pour la délivrance de l'ARNm incluent le PepFec14 (van den Brand et al., 2019).

Par ailleurs, les nanoémulsions sont constituées d'un noyau d'huile stabilisé par une enveloppe lipidique qui permet à l'ARNm de s'associer à sa surface (Gurpreet et al., 2018). Le produit MF59 de Novartis, une nanoémulsion approuvée par la FDA, a été utilisé comme adjuvant dans les vaccins contre la grippe (Vesikari et al., 2012). En tant qu'adjuvant, le MF59 améliore l'efficacité du vaccin en favorisant la sécrétion de chimiokines par les cellules du site d'injection, ce qui entraîne une augmentation du recrutement des cellules présentatrices de l'antigène (Seubert et al., 2011; Calabro et al., 2013).

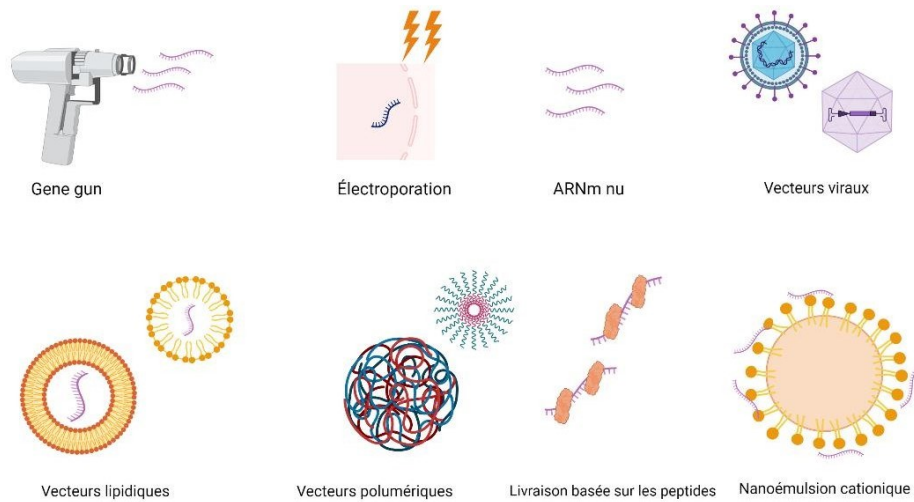


Figure 4. Schéma illustrant les diverses méthodes de délivrance de l'ARNm pour des applications vaccinales.

Image créée par BioRender.com

1.5 Chitosane

1.5.1 Propriétés physico-chimiques du chitosane

Le chitosane est un polymère naturel linéaire dérivé de la déacétylation de la chitine, un autre polymère présent dans l'exosquelette des crustacés. Il se classe comme le deuxième biopolymère le plus répandu dans la nature après la cellulose, ce qui en fait un matériau attrayant dans le domaine biomédical en raison de ses propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité et de faible toxicité (Chandy et Sharma, 1990).

Pour obtenir le chitosane, la chitine subit généralement un traitement de décoloration avec du permanganate de potassium, suivi d'une déacétylation en le chauffant avec de l'hydroxyde de sodium (Younes et Rinaudo, 2015). Le chitosane est composé d'unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons β -(1-4) glycosidiques. La distinction entre chitine et chitosane dépend du pourcentage d'unités de N-acétyl-D-glucosamine présentes dans la chaîne du polymère. Lorsque ce pourcentage est supérieur à 50%, on parle de chitine, tandis que s'il est inférieur à 50%, on parle de chitosan (Hudson et Jenkins, 2002).

Trois propriétés essentielles du chitosane sont déterminantes dans ses applications : le degré de déacétylation (DDA), qui correspond à la proportion d'unités désacétylées (D-glucosamin) présentes dans la chaîne du polymère ; le poids moléculaire (MW), qui reflète la longueur du polymère ; et enfin, sa viscosité, qui est liée à sa capacité à former une solution visqueuse une fois solubilisé dans un solvant aqueux acidifié (Aranaz et al., 2021).

Le DDA joue un rôle crucial, car il influe sur la solubilité, la biodégradabilité et la capacité du chitosan à interagir avec les acides nucléiques. A un pH < 6 (environ 6.5 étant le pKa du chitosan), les groupes amines du polymère sont protonés dans un milieu acide (Domard, 1987). Cela confère une charge positive au chitosane, augmentant ainsi sa dissolution. Par conséquent, un degré de DDA élevé entraîne une plus grande charge

positive du chitosane, le rendant plus soluble et favorisant également son interaction électrostatique avec les acides nucléiques tels que l'ADN plasmidique, l'ARNm et les siARN, etc (Mao et al., 2010). Cela permet de former des nanoparticules dans le contexte de la livraison de gènes. Cependant, cette propriété présente également des inconvénients en termes de toxicité et de biodégradabilité du chitosane. Des études ont montré que l'augmentation du degré de DDA du chitosane réduit sa biodégradabilité, ce qui peut entraîner une accumulation de ce polymère dans les tissus et potentiellement augmenter sa toxicité (Matica et al., 2017 ; Kean et Thanou., 2010).

La détermination du poids moléculaire du chitosane est couramment réalisée par chromatographie d'exclusion (Beri et al., 1993), et il joue un rôle essentiel dans la liaison et la protection de l'acide nucléique (Mendes et al., 2022). Le poids moléculaire est souvent modifié par hydrolyse du polysaccharide (Poshina et al., 2018). Des études ont révélé que le poids moléculaire impacte la cytotoxicité et l'efficacité de transfection. En effet, un faible poids moléculaire est associé à une moindre toxicité et facilite la libération de l'acide nucléique, mais il présente une efficacité de transfection réduite (Huang et al., 2005).

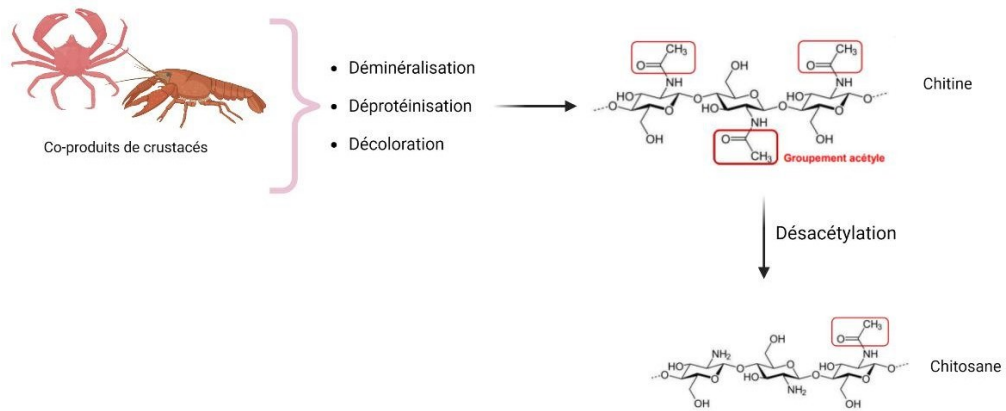


Figure 5. Structure chimique de la chitine et du chitosane

Adaptée et modifiée de
[http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Chitine et chitosan vf.pdf](http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Chitine_et_chitosan_vf.pdf)

Image créée par BioRender.com

1.5.2 Utilisation du chitosane dans la formation des nanoparticules à ARN

Ces dernières années, l'intérêt pour l'utilisation du chitosane dans la formulation de nanoparticules d'acides nucléiques a considérablement augmenté dans le domaine de la thérapie génique non virale. Cependant, l'utilisation de molécules d'ARN telles que le siARN, miARN, ARNm, etc., à des fins thérapeutiques a été difficile en raison de leur sensibilité à la dégradation par les nucléases, rendant leur délivrance complexe (Liu et al., 2007).

Le chitosane peut former des polyplexes par interaction électrostatique entre les groupes amines chargés positivement du polymère et les groupes phosphates chargés négativement de l'acide nucléique, ce qui est souvent connu sous le terme de ratio N/P (Gary et al., 2013 ; Peniche et Peniche, 2011). Ce ratio joue un rôle crucial dans la formulation des nanoparticules, car il garantit la stabilité du polyplexe, son interaction avec la membrane cellulaire, et finalement la libération de l'acide nucléique à l'intérieur de la cellule (Zhao et al., 2009). Plusieurs méthodes ont été développées pour former ces nanoparticules chitosane-ARN dont les deux principales sont la méthode de complexation polyélectrolytique et le protocole de gélification ionique (Kamat et al., 2016 ; Thandapani et al., 2017). Dans la méthode de complexation polyélectrolytique, le polymère et l'acide nucléique sont agités manuellement pour favoriser leur interaction électrostatique (Figure 6). Quant au protocole de gélification ionique, il utilise un agent de réticulation tel que le TPP, qui renforce les nanoparticules en formant des ponts entre le chitosane et l'ARN, augmentant ainsi leur stabilité (Kunjachan et al., 2010).

Après la formation des nanoparticules, il est essentiel de les caractériser en évaluant leur taille et leur potentiel zêta (charge de surface). Un potentiel zêta positif indique une interaction plus forte entre la nanoparticule et la membrane cellulaire chargée négativement, ce qui peut faciliter l'internalisation des nanoparticules (Wang et al., 2011).

1.5.3 Stratégies pour améliorer la livraison des nanoparticules Chitosane-ARNm

1.5.3.1 Pégylation (PEG)

La pégylation consiste à attacher des chaînes de polymère de polyéthylène glycol (HO-CH₂-CH₂-OH) aux groupes amines du chitosane, ce polymère est connu comme biodégradable et non toxique (Malhotra et al., 2011). Cette modification offre plusieurs avantages aux nanoparticules. Premièrement, elle améliore leur stabilité en prévenant leur agrégation et leur interaction avec les protéines présentes dans le sang (Nelson et al., 2013). En effet, le PEG est un polymère hydrophile qui agit comme une barrière stérique, empêchant la formation d'une couche de protéines (corona protéique) autour des nanoparticules (Suk et al., 2016). De plus, la pégylation prolonge le temps de circulation et la demi-vie des nanoparticules en réduisant leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial, ce qui les aide à échapper à l'élimination rapide par le système immunitaire du corps (Veronese et Pasut, 2005).

1.5.3.2 Diisopropylethylamine (DIPEA)

Le DIPEA (N,N-diisopropylethylamine) est un composé organique classé parmi les amines tertiaires (Ershov et al., 2019). Cette amine est largement utilisée en synthèse organique comme accepteur de protons. Lorsqu'il est greffé sur le chitosane, le DIPEA remplace certains groupes amine du polymère en position C-2, ce qui entraîne la formation d'une liaison covalente entre le chitosane et le groupe DIPEA (Martinez et al., 2022).

L'ajout du groupe DIPEA augmente le nombre de groupes amine tertiaires dans la chaîne du polymère, ce qui le rend plus réactifs envers les acides. Cela conduit à une augmentation de la charge positive du polymère, renforçant ainsi l'interaction électrostatique avec l'acide nucléique chargé négativement (de Souza et al., 2018).

Ceci va favoriser la stabilité des nanoparticules. En plus d'augmenter la stabilité, le greffage des groupes DIPEA dans la chaîne du polymère augmente la capacité tampon du chitosane (Martinez et al., 2022). Cette propriété est avantageuse pour l'échappement des nanoparticules, selon la théorie de l'éponge à proton (voir section 1.7).

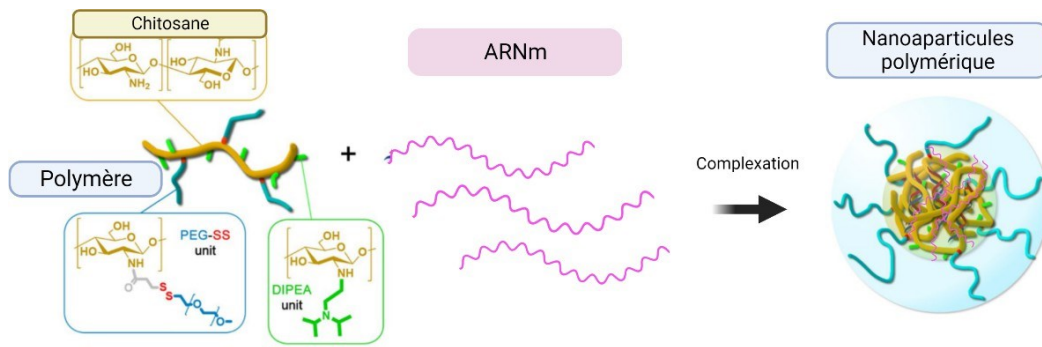


Figure 6. Représentation schématique des modifications apportées au chitosane ainsi que de la formulation de nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm

Adaptée et modifiée de (Martinez Junior et al., 2022).

Image créée par BioRender.com

1.6 Cytotoxicité

A l'heure actuelle, les nanoparticules sont de plus en plus utilisées dans divers domaines, notamment en biomédecine pour la délivrance de gènes, le traitement du cancer, et d'autres applications (Aghebati-Maleki et al., 2020 ; Chen et al., 2016). Cette croissance rapide a suscité un vif intérêt pour évaluer leur toxicité. Lors de cette évaluation, plusieurs facteurs sont pris en compte, tels que les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules (taille, charge, composition chimique, degré de désacétylation et poids moléculaire), la méthode de préparation de la suspension de nanoparticules, la dose administrée, le type de cellule utilisé pour les tests, ainsi que la méthode d'analyse pour interpréter les résultats (Kong et al., 2011).

Des études ont montré que le poids moléculaire et le pourcentage de désacétylation du chitosane peuvent influencer la cytotoxicité (Lavertu et al., 2006). Un chitosane avec un faible poids moléculaire et un faible degré de désacétylation est moins susceptible d'être cytotoxique car il est plus susceptible d'être dégradé par les enzymes. Par exemple, une étude a montré qu'un chitosane avec un degré de désacétylation inférieur à 70% est plus susceptible d'être dégradé qu'un chitosane avec un degré de désacétylation supérieur à 70% (Huang et al., 2004). De même, un faible poids moléculaire de 10 kDa est considéré comme non cytotoxique (Fernandes et al., 2012 ; Lee et al., 2001). La préparation de la suspension de nanoparticules peut également affecter les résultats de cytotoxicité. Les nanoparticules peuvent s'agglomérer en fonction de leur taille et de leur charge de surface, et la présence d'impuretés dans la suspension peut altérer l'effet réel des nanoparticules sur la toxicité (Lewinski et al., 2008).

Le choix de la dose administrée aux cellules est également important. En général, des concentrations variantes entre 30 et 500 $\mu\text{g/ml}$ sont considérées comme non cytotoxiques, en fonction du type de cellules utilisées et des modifications apportées aux nanoparticules de chitosane (Loutfy et al., 2016). Aussi, le type de cellules utilisées

est généralement choisi en fonction de la route d'administration souhaitée (intraveineuse, sous-cutanée, orale, etc.). Pour les considérations éthiques et la facilité de mise en œuvre, les essais *in vitro* sont préférés (Kong et al., 2011).

Enfin, le choix de l'essai de cytotoxicité est essentiel pour éviter d'obtenir des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Les essais *in vitro* les plus couramment utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire sont le test 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxyméthoxyphényl) -2-(4-sulfophényl) -2H-tétrazolium) (MTS), le test 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), le test au bleu d'alar et le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) pour évaluer la mort cellulaire (Wörle-Knirsch et al., 2006). Pour les essais *in vivo*, les mesures de différence de poids corporel et les évaluations histologiques avant et après administration sont souvent utilisées (Kanipandian et al., 2014). Le choix du test est important car l'interaction entre les nanoparticules et le colorant utilisé dans l'essai peut entraîner des interférences dans la lecture des résultats. Par exemple l'utilisation de nanoparticules d'aluminium a montré une interaction avec le colorant du test MTT, entraînant une interprétation erronée des données (Monteiro-Riviere et al., 2010).

En général, l'évaluation de la cytotoxicité de nanoparticules dépend de plusieurs paramètres, et les paramètres mentionnés ci-dessus sont importants et doivent être pris en considération avant le début de chaque étape de l'expérience.

1.7 Internalisation et échappement endosomal

Dans cette section, nous examinerons les différents mécanismes d'internalisation et d'échappement endosomal des nanoparticules. Comprendre ces mécanismes est crucial car des études ont établi un lien entre les voies d'internalisation et le sort de l'acide nucléique. La littérature propose plusieurs mécanismes, et nous nous concentrerons ici sur les plus pertinents.

1.7.1 Pression osmotique (hypothèse de l'éponge à proton)

Dans ce mécanisme, les polymères cationiques jouent un rôle essentiel en raison de leur capacité tampon, qui leur permet d'accepter les ions H⁺ pour maintenir le pH constant (Selby et al., 2017). Lorsque les nanoparticules sont internalisées par endocytose et parviennent à l'endosome/lysosome mature, celui-ci commence à pomper des protons H⁺ accompagnés d'ions chlore (Cl⁻) (Vermeulen et al., 2018). Cette accumulation d'ions entraîne une augmentation de l'osmolarité dans l'endosome, ce qui provoque l'entrée d'eau par osmose. L'augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de l'endosome/lysosome entraîne son éclatement, permettant ainsi l'échappement du contenu des endosomes (Hu et al., 2007). Cette hypothèse a été principalement émise pour les polymères cationiques tels que les dendrimères de poly(amidoamine) (PAMAM) et le PEI (Boussif et al., 1995 ; Behr et al., 1997 ; Patil et al., 2009). Une étude a montré que les endosomes contenant du PEI, caractérisé par une forte capacité tampon, étaient plus volumineux que ceux contenant de la polylysine (PLL), qui ne possède pas de capacité tampon (Richard et al., 2013). Cependant, cette hypothèse ne s'applique pas à tous les polymères, comme le poly(N,N-diméthylacrylamide) (pDAMA). Bien que ce dernier présente une capacité tampon, plusieurs études ont démontré que cette capacité tampon seule n'est pas suffisante pour provoquer la libération du contenu des endosomes (Funhoff et al., 2004).

En complément de l'hypothèse de l'éponge à proton, une étude a mis en évidence le

rôle du phospholipide anionique, appelé lysobisphosphatidique (LBPA), présent à l'intérieur de la membrane endosomale (Degors et al., 2019). Ce phospholipide facilite l'interaction électrostatique avec le polymère une fois protoné, ce qui entraîne la déstabilisation de la membrane. Parallèlement à l'augmentation de la pression osmotique, cela crée une fuite dans la membrane endosomale, permettant ainsi l'expulsion du contenu de l'endosome (Durymanov et Reineke, 2018).

Un autre mécanisme proposé par Massignani et al. (2010) postule que la baisse du pH dans l'endosome entraîne le désassemblage du polymère en monomères (Massignani et al., 2010). Ceci induit une augmentation de la pression osmotique, ce qui provoque finalement l'échappement du contenu endosomal (Smith et al., 2018).

1.7.2 Fusion membranaire

Ce mécanisme est souvent observé dans les nanoparticules lipidiques ou les polymères hybrides, qui combinent à la fois les propriétés d'un polymère et les caractéristiques d'un lipide (Rayamajhi et al., 2020). Dans ce processus, l'insertion de fusogènes tels que des peptides ou des protéines est essentielle. Ces fusogènes interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la membrane de l'endosome, ce qui permet la fusion de la membrane de l'endosome avec celle de la cellule (Varkouhi et al., 2011). Cette fusion résulte en la libération du contenu de l'endosome dans le cytosol cellulaire. Des exemples de peptides fusogènes couramment utilisés incluent KALA et Sweet Arrow Peptide (SAP) (Pujals et al., 2006 ; Varkouhi et al., 2011). De plus, les lipides tels que le DOPE ont également montré leur capacité à fusionner avec la membrane endosomale (Wasungu et Hoekstra, 2006). Une étude menée par Safinya et al. (2001) a révélé que le DOPE subit un changement de conformation structurelle dans les lipoplexes d'ADN, ce qui lui permet d'interagir plus efficacement avec la membrane anionique, entraînant ainsi la fusion membranaire et la libération de l'ADN (Ewert et al., 2004 ; Safinya et al., 2001).

1.7.3 Utilisation des agents photosensibles

Ce mécanisme est mis en œuvre à l'aide de divers types de nanoparticules, notamment les polymères, les lipides et autres vecteurs de livraison. Il repose sur l'utilisation d'agents photosensibles qui sont également internalisés par endocytose avec les nanoparticules (Cabral et al., 2009 ; Fretz et al., 2007). Une fois à l'intérieur de l'endosome, ces agents photosensibles sont activés par une longueur d'onde spécifique, ce qui génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Berg et al., 1999). Ces dérivés ont la capacité de rompre la membrane endosomale, permettant ainsi la libération du contenu des endosomes (Lou et al., 2006). Certains exemples d'agents photosensibles utilisés incluent le dendrimère phtalocyanine (DPc), la tétraporphine tétrasulfonate (TPPS4), la phtalocyanine d'aluminium disulfonée (AlPcS2a), et d'autres encore (Prasmickaite et al., 2001).

Une approche prometteuse consiste à combiner l'utilisation de nanoparticules polymères de poly(acide lactique-co-acide glycolique-co-acide hydroxyméthyl glycolique) (PLGHMGA) pour la délivrance sélective de la saporine qui est une protéine cytotoxique et est utilisée comme agent anticancéreux, dans le cytosol des cellules cancéreuses HER2 avec la technique de photochimiothérapie (PCI). Cette approche utilise le PS méso-tétraphényl porphyrine disulfonate (TPPS 2a) comme agent photosensibilisateur. Les résultats ont montré une forte inhibition de la prolifération cellulaire et une diminution de la viabilité cellulaire grâce à l'induction de l'apoptose (Martínez-Jothar et al., 2019).

CHAPITRE 2 Objectif et hypothèses

2.1 Problématique et sujet d'étude

L'utilisation thérapeutique de l'ARNm présente un défi majeur. Lorsqu'il pénètre dans le corps, il peut échouer à produire les effets souhaités en raison de sa susceptibilité à la dégradation par les nucléases ainsi que sa courte durée de vie (Jianghua Li et al., 2018). Plusieurs études ont proposé des méthodes pour surmonter ces problèmes, notamment le développement de nanomatériaux en tant que systèmes de livraison. Ces derniers encapsulent l'ARNm en le protégeant de la dégradation par les nucléases. De plus, de tels systèmes devraient être capables de s'échapper de l'endosome. Néanmoins, les recherches sur la livraison de l'ARNm demeurent limitées en grande partie en raison de leur instabilité et des défis associés à leur conservation (Bose et al., 2019).

Question de recherche à étudier est la suivante : Le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} (Figure 6) peut-il assurer une transfection efficace et une stabilité maximale de l'ARNm *in vitro* en utilisant un système de livraison comprenant CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm ?

2.2 Hypothèses de recherche

Pour répondre à cette question, nous formulons l'hypothèse que les nanoparticules à base de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm conduisent à :

- Présentent une meilleure protection de l'ARNm contre la dégradation par les RNases pour une durée déterminée.
- Engendrent une faible toxicité cellulaire.
- Montrent une efficacité de transfection *in vitro* équivalente à celle des nanovecteurs lipidiques.

2.3 Objectifs

Ce projet a pour but de proposer une nouvelle plateforme vaccinale basée sur des nanoparticules non cytotoxiques, composées de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm, afin d'optimiser la protection, le transport et l'expression génique *in vitro*. Notre équipe de recherche a synthétisé un chitosane modifié avec DIPEA, variant entre 5 et 55%, ainsi qu'une pégylation, variant entre 1 et 3%. Seules les variantes de chitosane avec les modifications DIPEA 5, 15, 34 et 55%, associés à une pégylation entre 1.3 et 2.6%, ont été testées. Pour les premières expériences, nous avons formé des polyplexes en combinant le chitosane modifié avec le siRNA-TNF α . Les résultats de la caractérisation physico-chimique ont révélé une formation efficace de nanoparticules, une charge de surface positive, une stabilité colloïdale satisfaisante et une non cytotoxicité sur les fibroblastes et les RAW 264.7. Dans le cadre de ce projet nous avons délibérément opté pour l'utilisation de DIPEA₅₃ et PEG_{1.5} pour complexer avec l'ARNm, car selon les résultats obtenus, les degrés élevés de greffage de DIPEA semblent être les plus prometteurs pour maintenir la stabilité des nanoparticules dans un milieu biologique (Martinez Junior et al., 2022). Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Examiner la complexation et les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm.
- Étudier l'effet des RNases sur les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm.
- Évaluer la toxicité des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm ainsi que du polymère non complexé sur différentes lignées cellulaires.
- Évaluer la transfection *in vitro* des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm dans diverses lignées cellulaires.

CHAPITRE 3 MATERIELS ET MÉTHODES

3.1 Préparation des nanoparticules

CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} a été dissout pendant une nuit dans une solution d'HCl 0.1 M, puis chauffé à 50°C pendant 30 min. Il a ensuite été dilué avec une solution de tampon phosphate saline (PBS) (1X, pH 7.4) jusqu'à une concentration finale de 1 mg/ml (solution mère) et enfin filtré avec un filtre à membrane en polyéther sulfone à 0.45 µm. Pour préparer les nanoparticules CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP, des quantités variées de CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15} ont été ajoutées à une solution d'ARNm-EGFP de concentration fixe 1[µg/µl] pour obtenir des ratios N/P (ratio entre les groupes amine du polymère chargé positivement et le groupes phosphate d'acide nucléique chargés négativement) allant de (2:1, 3:1, 4:1, 10:1, 15:1). La solution finale a été vortexée et conservée à température ambiante.

3.2 Électrophorèse sur gel agarose

La formation des nanoparticules a été confirmée par un test de migration sur gel d'agarose à 2%. 15 µl du complexe contenant 1[µg] d'ARNm-EGFP ont été chargés dans les puits. L'électrophorèse a été réalisée à 100 V dans un tampon Tris borate- EDTA (TBE) à 1X pendant 45 min. Le gel a ensuite été placé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 5 min pour la coloration. Après incubation, le gel a été rincé à l'eau froide du robinet, puis visualisé avec un trans-illuminateur UV (800 ms). Cette expérience a été effectuée en triplicata.

3.3 Détermination de la taille, du potentiel- ζ et de l'indice de polydispersité (PDI)

Le Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) a été utilisé pour mesurer la taille, l'indice de polydispersité (PDI) et le potentiel- ζ des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1,15}/ANRm-EGFP.

Pour déterminer la taille, une solution de nanoparticules contenant 3 $\mu\text{g/ml}$ d'ANRm-EGFP a été préparée, versée dans une cuvette (D-51588, Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) et mesurée en suivant le principe de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Celui-ci permet d'évaluer le mouvement brownien des nanoparticules en solution résultant du bombardement par un faisceau monochromatique en rapportant ce mouvement à la taille des nanoparticules (Stetefeld, J.,2016). Ensuite, la même solution a été placée dans une cellule capillaire (DTS1061, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) pour mesurer le potentiel- ζ qui est une estimation de la répulsion ou l'attraction électrostatique entre les particules dans la solution (Clogston et Patri, 2011). Chaque mesure a été effectuée en triplicata.

3.4 Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation de l'ANRm-EGFP a été estimée à l'aide du réactif Quant-iT Ribogreen (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Après complexation du vecteur avec l'ANRm-EGFP, une quantité de 100 μl de solution Ribogreen diluée a été mélangée avec les nanoparticules puis incubée pendant 5 min à température ambiante. Le signal de fluorescence a été mesuré ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 492/540 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques TECAN M200. Le pourcentage d'efficacité d'encapsulation (EE%) a été calculé avec la formule suivante, où l'ANRm libre est pris comme contrôle négatif (sans l'ajout du chitosane) et l'ANRm non complexé désigne l'ANRm qui n'a pas été associé au polymère :

$$EE \% = \frac{\text{Fluorescence ANRm libre} - \text{Fluorescence ANRm non complexé}}{\text{Fluorescence ANRm libre}} \times 100$$

3.5 Libération de l'ARNm des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG/ARNm

Afin de libérer l'ARNm-EGFP une fois complexé avec le CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15}, plusieurs solutions ont été testées pour pouvoir libérer l'ARNm-EGFP du polymère, notamment, la chitosanase [5mU/ μ l], l'héparine 1 mg/ml et une solution à 3 et 10% de déodécyl sulfate de sodium (SDS). Les nanoparticules ont été préparées comme décrit précédemment à un volume final de 12 μ l. Pour chaque solution testée, un volume de 3 μ l a été ajouté aux 12 μ l de nanoparticules. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 50°C pendant 20 min puis incubé une heure à température ambiante. L'ARNm-EGFP décomplexé a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% à 100V pendant 45 min. Ce test a été effectué en préalable à l'évaluation de l'intégrité de l'ARNm- EGFP suite à son incubation avec la RNase.

3.6 Quantification et analyse de l'intégrité de l'ARNm contre la digestion des RNases A en fonction du temps

Cette partie du projet vise à évaluer la quantité d'ARNm préservé de la dégradation enzymatique après son encapsulation avec le nanovecteur. Pour cela, nous avons opté pour une transcription *in vitro* à partir d'un plasmide pLac+thiM-ON-tetA::gfpuv, lequel exprime le gène gfpuv qui est un variant du gène GFP (Green Fluorescent Protein).

3.6.1 Amplification de l'ADN

Le thermocycleur 'C1000 touch-thermal cycler Bio-Rad' a été utilisé pour amplifier l'ADN TetA-gfpuv du plasmide pLac+thiM-ON-tetA::gfpuv (Figure 7). Pour cela, l'ADN TetA-gfpuv, une séquence du promoteur T7 'TAATACGACTCACTATAG' a été rajoutée à l'amorce sens (tableau 1). La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 100 µl contenant : le tampon de la polymérase 1X, 200 µM de dNTPs, les amorces sens (F TetA-gfpuv) et anti-sens (R TetA-gfpuv) à 1 µM, 1 µl d'ADN matrice, 1 U de la taq ADN polymérase. Le volume est complété par l'eau milliQ stérile. La PCR a été réalisée en suivant les étapes suivantes, pour 35 cycles, les étapes 2 à 4 sont répétées.

- 1- Dénaturation à 95°C pendant 5 min
- 2- Dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
- 3- Hybridation à 53°C Pendant 30 secondes
- 4- Première Élongation à 68°C Pendant 2 min
- 5- Élongation finale à 68°C pendant 5 min

Tableau 2. Séquences des amorces pour amplifier l'ADN

Nom	Type	Séquence
F TetA-gfpuv	Amorce sens	TAATACGACTCACTATAGagagggtgaaggatgcaa
R TetA-gfpuv	Amorce anti-sens	Tgtgtaatcccagcagcagt

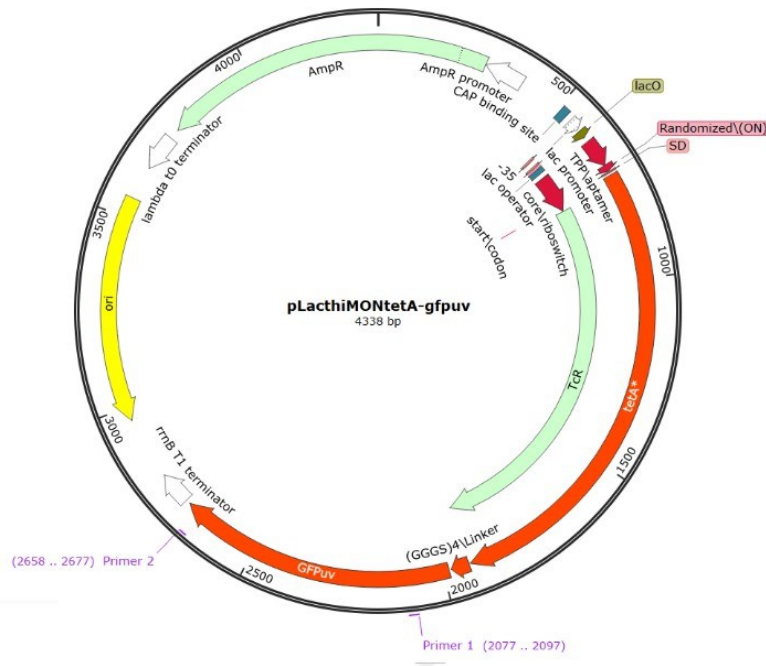


Figure 7. Plasmide pLacthiMONTetA-gfpuv

3.6.2 Électrophorèse sur gel agarose

La vérification de la taille des produits PCR a été effectuée sur gel agarose à 2%. Pour ce faire, 5 µl des produits PCR ont été mélangés avec un 1 µl de tampon de chargement contenant du bleu de migration natif 6 X (40% de sucrose, 0.05% de bleu de bromophénol et 0.05% de bleu de xylène cyanol). La migration a été effectuée dans un tampon Tris Acétate EDTA (TAE) 1X pendant 45 min à 100 V. Enfin, l'appareil GelDoc a été utilisé pour visualiser les résultats.

3.6.3 Transcription *in vitro*

Une réaction de transcription a été effectuée dans un volume de 100 µl comprenant 20 µl de tampon de transcription 5X, des ribonucléotides 2 mM (ATP, UTP, CTP, GTP), 40 µl d'ADN (produit de PCR), 1 µl de pyrophosphatase 50X, 1 U/µl d'ARN polymérase, 0.5 µl [α -³²P] ATP, 1U/µl d'inhibiteur de RNase et du H₂O milliQ stérilisé. La réaction a été incubée pendant 3 heures à 37°C, puis 1 µl de DNase a été ajoutée et l'incubation

a continué pendant 30 min supplémentaires à 37°C. L'ARNm-gfpuv marqué a été précipité avec l'ajout de 20 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5.2 et 500 µl d'éthanol 95%, puis conservé à -80°C toute la nuit.

3.6.4 Électrophorèse sur gel polyacrylamide

Pour purifier l'ARNm-gfpuv, une migration sur gel polyacrylamide a été effectuée. Après incubation à -80°C pendant la nuit, le mélange a été centrifugé puis le culot a été séché pendant 10 min. L'ARNm-gfpuv a été resuspendu dans 10 µl de H₂O et 10 µl de bleu formamide. L'échantillon a été migré sur gel polyacrylamide dénaturant 6% : 12 ml d'acrylamide 20% (le rapport appliqué était de 19 :1 acrylamide : bisacrylamide, Tris Borate EDTA 1X [TBE] [89 mM Tris pH 7,6, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA] et urée 8M) et dilué dans 28 ml d'une solution urée 8 M, TBE 1X. Pour polymériser le gel, 16 µl de Tetra Méthyl Ethylène Diamine (TEMED) et 320 µl d'ammonium PerSulfate (APS) 10% ont été ajoutés. Le gel a été migré pendant 1h à 16 W. Suite à la migration une plaque phosphore (storage phosphor screen, Molecular Dynamics) a été exposée sur le gel pendant 5 min, puis scannée par le Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences). Ceci permet le positionnement de la bande correspondant à la taille de l'ARNm-gfpuv. L'ARNm-gfpuv a été élué une nuit à 4°C puis précipité avec 1 ml d'éthanol 70% et 50 µl d'acétate de sodium.

3.6.5 Cinétique de dégradation de l'ARN dans les nanoparticules en présences d'RNase A

Pour évaluer la capacité de protection de l'ARNm-gfpuv en présence d'RNase A, les nanoparticules ont été préparées en ajoutant de l'ARNm-gfpuv précédemment marqué avec [α -³²P] ATP à une concentration de 1 [µg/µl]. Une fois les nanoparticules formées, une concentration de 0.01 [µg/µl] d'RNase a été ajouté. Après des temps d'incubation de 2 h, 6 h et 24 h, 3 µl de SDS à 10% ont été ajoutés pour libérer

l'ARNm-gfpuv du polymère. Les aliquotes ont ensuite été incubés 20 min à 50°C et mis dans 20 µl de bleu formamide. Pour désactiver la RNase A, 1µl de RiboLock [40U/µl] a été ajouté à chaque échantillon.

Les produits des réactions ont été migrés sur gel polyacrylamide 8% pendant 2 heures à 60 W. Une plaque phosphore a été exposée au gel pendant une nuit et scannée le lendemain à l'aide du typhoon.

Cette expérience a également été répétée en préparant des nanoparticules avec un ARNm-EGFP (CleanCap® Enhanced Green Fluorescent Protein mRNA, Trilink Biotechnologies, San Diego, CA, USA) non marqué pour des périodes d'incubation de 2h, 24h et 48h. Les aliquotes ont été migrés sur gel agarose à 2% à 100 V pendant 45 min.

3.7 Tests *in vitro*

3.7.1 Culture cellulaire

Les cellules de macrophages murins RAW 264.7, les kératinocytes épidermiques primaires (HEKa) et les cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2) ont été achetées de 'American Type Culture Collection' (ATCC) (Manassa, VA, États-Unis). Elles ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM : *Dulbecco Modified Eagle Medium*) (WISENT Bioproduct Inc, Montréal, Qc, Canada), milieu de croissance des kératinocytes (CELL application Inc, San Diego, CA, USA) et milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM : *Eagle's Minimum Essential Medium*) (WISENT Bioproduct Inc, Montréal, Qc, Canada), respectivement. Pour les cellules RAW 264.7 et les Caco-2 le milieu a été complété avec 10% de sérum foetal de bovin inactivé (FBS : *fetal bovine serum*) et 1% de penicillin-streptomycin (P/S) (WISENT Bioproduct Inc, Montréal, Qc, Canada).

3.7.2 Décongélation et passage cellulaire

Les cryovials contenant les cellules ont été rapidement immergés dans un bain marie à 37°C tout en étant agités. Une fois dégelé, le contenu du cryovial a été transféré dans un tube de 50 ml préalablement rempli avec 10 ml de milieu de culture. Ensuite, les cellules ont été centrifugées à 1200 rpm pendant 10 min (sauf pour les kératinocytes). Après la centrifugation, le surnageant est jeté en raison de la présence de DMSO, un solvant toxique pour les cellules. Le culot est resuspendu avec 10 ml de milieu complet. La suspension cellulaire a été versée dans une flasque de 175 cm² contenant 40 ml de milieu de culture et munie d'un bouchon filtrant, puis mise dans un incubateur à 37°C, avec un taux de CO₂ de 5% et une humidité de 95%.

Les cellules utilisées sont de type adhérent, capables de se fixer dans le fond de la flasque. Lorsque les cellules recouvrent 80% de la surface de la flasque, il est important de procéder au passage cellulaire afin d'éviter une diminution de la croissance et/ou de la viabilité. Pour cela, le milieu de culture est vidé dans un bécher destiné aux déchets liquides. Ensuite, pour décoller les cellules du fond de la flasque, 10 ml de solution trypsine/EDTA (0.025%), phenol-red (WISSENT Bioproduct Inc, Montréal, Qc, Canada) et trypsine/EDTA (1X) (Life Technologies, Grand Island, USA) ont été ajouté aux Caco-2 et HEKa, respectivement. Les cellules RAW macrophages 264.7 murins, quant à elles, sont détachées à l'aide d'un grattoir. Après un temps d'incubation de 5 min à température ambiante, les cellules se détachent de la surface et la trypsine est neutralisée en ajoutant 10 ml du milieu complet ou une solution neutralisante de trypsine. Ensuite, le contenu de la flasque est récupéré et centrifugé à 1200 rpm pendant 10 min. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu dans un volume spécifique de milieu de culture pour permettre le dénombrement des cellules.

Les RAW 264.7, Caco-2 et HEKa ont été utilisées à leur cinquième, deuxième et deuxième passage respectivement.

Chaque expérience décrite ci-dessous utilise des échantillons définis en fonction du nombre de cellules, qui a été mesuré à l'aide de la méthode de coloration au bleu de Trypan 0.4% (Sigma Aldrich ®) et d'un hemocytomètre pour le comptage cellulaire.

3.7.3 Viabilité et toxicité cellulaire

Deux test colorimétriques distincts ont été utilisés pour mesurer l'effet du polymère CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} et des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP sur la viabilité cellulaire : Le test MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)- 2H-tétrazolium) 2H-tétrazolium, G5421, Promega, Madison, WI, USA) qui est basé sur la réduction du composé MTS par des cellules viables et le test LDH (11644793001, Roche, Laval, QC, Canada) qui évalue la libération de l'enzyme lactate déshydrogénase après détérioration de la membrane plasmique. Ces deux tests ont été réalisés sur des cellules RAW 264.7, Caco-2 et HEKa.

3.7.3.1 Test MTS

Les cellules viables sont capables de réduire le réactif tétrazolium (MTS) en présence de méthosulfates de phénazine (PMS) pour former un produit coloré soluble appelé formazan. Cette réaction est médiée par des enzymes dépendantes de NAD(P)H-déhydrogénase. La quantité de formazan produite est directement liée à la quantité de cellules viables qui est mesurée par lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 490-500 nm (Kuetze, V, 2017).

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits, avec une densité de 35 000 cellules/puit pour les RAW macrophages 264.7 murins et les cellules HEKa et de 15 000 cellules/puit pour les Caco-2. Les cellules RAW macrophages 264.7 murins et Caco-2 ont été incubées dans un milieu sans rouge phénol contenant 10% de FBS avec 1% P/S et les cellules HEKa dans un milieu de croissance des kératinocytes, pendant 24 h. Ensuite, le milieu a été remplacé par 150 µl d'un nouveau milieu contenant 1% de FBS pour les

cellules RAW 264.7, Caco-2 et un nouveau milieu de croissance des kératinocytes pour les HEKa, avec un volume de 50 µl d'échantillon, et incubé à 37°C pendant 48 h. Le milieu de culture a ensuite été transféré dans une nouvelle plaque à 96 puits pour effectuer le test LDH (Lactate déshydrogénase). Une solution de 1 :20 (PMS : MTS) a été préparé et 120 µl de ce mélange a été ajouté à chaque puit de la plaque dédiée au test MTS. Environ 1h après l'incubation de la plaque à 37°C et 5% de CO₂, la densité optique a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur microplaque ELISA Universal Microplate Reader EL800IU (Bio-Tek Instruments, USA) et du logiciel KC Junior (version 1.6).

3.7.3.2 Test LDH

Lorsque la membrane plasmique des cellules est endommagée, l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) est libérée dans le milieu de culture cellulaire. Pour quantifier l'activité de la LDH, le NADH produit lors de la conversion du lactate en pyruvate est utilisé pour réagir avec le sel tétrazolium (INT) formant ainsi un produit de couleur rouge et soluble dans le milieu de culture, qui peut être mesuré à une longueur d'onde de 490- 500 nm. La quantité du produit formée est directement proportionnelle à la quantité de la LDH présente dans le milieu de culture (Kumar, P.2018).

Brièvement, 100 µl d'un mélange réactionnel composé d'un catalyseur (Diaphorase/NAD⁺), d'une solution de chlorure d'iodotétrazolium (INT) et lactate de sodium a été ajouté à 100 µl de milieu de culture précédemment transféré à une nouvelle plaque de 96 puits pendant le test MTS. L'incubation a eu lieu à température ambiante pendant 30 minutes. La densité optique a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur microplaque ELISA Universal Microplate Reader EL800IU (Bio-Tek Instruments, USA) et du logiciel KC Junior (version 1.6).

Pour les deux tests de cytotoxicité effectués, le PBS a été utilisé comme contrôle négatif. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (à des concentrations de 250 µM, 750 µM, 1 mM, 2 mM

et 4 mM) et le triton X-100 (1% v/v) ont été utilisés comme contrôles positifs pour les tests MTS et LDH, respectivement. Les contrôles d'interférence de particules sans cellules ont été traités dans les mêmes conditions expérimentales.

La viabilité cellulaire et l'activité de LDH libérée ont été calculées à l'aide des équations suivantes :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Absorbance échantillon}}{\text{Absorbance controle}} \times 100$$

$$\text{LDH libérée (\%)} = \frac{\text{Absorbance échantillon} - \text{Absorbance controle}}{\text{Absorbance triton} - \text{Absorbance controle}} \times 100$$

3.8 Internalisation des nanoparticules CH-DIPEA₅₃- PEG_{1.15}/ARNm-EGFP-Cy5

Les lames à huit chambres Lab-TeK (Thermo Fisher Scientific Inc) ont été utilisées pour ensemercer les cellules à une densité de 35 000 cellules/puit pour les HEKa et RAW macrophages 264.7 murins et de 50 000 cellules/puit pour les Caco-2. Les cellules ont été incubées pendant 24 h à 37°C. Le jour suivant, les nanoparticules ont été préparées comme décrit précédemment contenant 1µg d'ARNm-EGFP, puis ajoutées à des milieux de transfection spécifiques, notamment DMEM avec et sans 10% de FBS, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) avec et sans 10% de FBS (pour les RAW macrophages 264.7 murins). EMEM avec et sans 10% de FBS, HBSS avec et sans 10% de FBS (pour les Caco-2). Le milieu de croissance des kératinocytes, HBSS sans FBS (pour les HEKa). Les cellules ont été incubées dans un incubateur à 37°C, avec un taux de CO₂ de 5% et une humidité de 95% pour une période de 48 h.

Le réactif JetMessenger (Polyplus Transfection®, Radnor, PA, USA) complexé avec l'ARNm-EGFP-Cy5 (RNA technologies & therapeutics, Inc, Montréal, Qc, Canada) selon les instructions du fabricant a été choisi comme contrôle positif.

Le PBS (Phosphate-buffered saline) a été utilisé comme substitut des nanoparticules pour les cellules non transfectées, servant ainsi de contrôle négatif.

3.9 Analyse par microscopie confocale

Après la transfection, les cellules ont subi trois lavages avec une solution de PBS 1X afin d'éliminer les nanoparticules non internalisées. Ensuite, elles ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages supplémentaires avec du PBS 1X, les cellules ont été perméabilisées en utilisant une solution de triton X-100 à 0.1% pendant 15 minutes à température ambiante. La phalloïdine Alexa Fluor™ 555 (0.5 unité) a été utilisée pour colorer l'actine pendant 30 minutes. Après un nouveau cycle de lavage, le noyau a été coloré avec Hoechst (33342) qui est contenu dans le milieu de montage Prolong Glass Antifade (Thermo Fisher Scientific Inc). Les lames ont été séchées à température ambiante pendant 24 h.

Pour colorer les endosomes, les cellules ont été incubées avec une solution de blocage (PBS 1X, 5% BSA, 0.1% de triton-X-100) pendant 60 minutes après la perméabilisation à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire LAMP1 (LAMP 1 : protéine membranaire associée aux lysosomes 1) (Cell signaling Technology, Inc.) pour une dilution de 1 :200 dans une solution tamponnée au phosphate contenant 1% de BSA et 0.1% de triton-X-100 pendant 24 h à 4 °C. Le lendemain, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS 1X avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) conjugué avec Alexa Fluor® 555 pour une dilution de 1 :500 dans une solution tamponnée au phosphate contenant 0.1% de BSA et 0.1% triton-X-100 pendant 1h à température ambiante. Le noyau a été coloré avec Hoechst. Les lames ont été préparées avec le ProLong et séchées à température ambiante pendant 24 h. Enfin, les cellules ont été analysées au microscope confocal

(Zeiss LSM-780) en utilisant Zen 3.5 blue edition (Carl Zeiss, Allemagne) avec un objectif de 60x pour déterminer l'internalisation des nanoparticules dans les cellules et les compartiments endolysosomaux. Le logiciel Fiji ImageJ (ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health) et le plugin JACoP ont été utilisés pour l'analyse de colocalisation des nanoparticules avec l'actine et le calcul du coefficient de Pearson.

3.10 Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism version 4. Les figures montrent l'erreur standard de la moyenne \pm SEM. La significativité statistique (* $p < 0.05$, $p^{**} < 0.01$) a été évaluée par une ANOVA à un facteur (test post hoc de Dunnett). Toutes les expériences proviennent d'au moins trois expériences indépendantes.

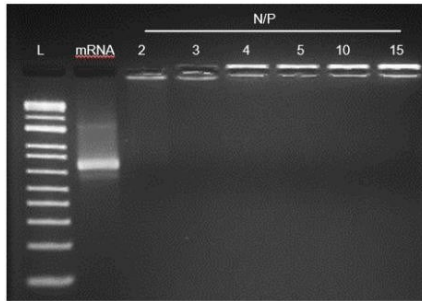
CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Caractérisation physicochimique des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} /ARNm-EGFP

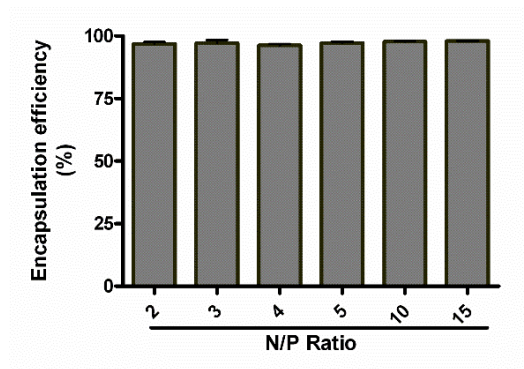
Les nanoparticules précédemment formées par l'addition d'ARNm-EGFP au chitosane doivent être correctement liées, ce qui signifie que les deux composants, à savoir le chitosane et l'ARNm-EGFP, doivent être bien associés. C'est pourquoi l'une des étapes fondamentales du protocole consiste à réaliser une électrophorèse. Cette technique permettra de déterminer le rapport N/P optimal, c'est-à-dire le nombre de groupes amines présents dans le vecteur CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15} et le nombre de groupes phosphates dans l'ARNm-EGFP. Nous avons choisi les rapports N/P de 3 :1 et 4 :1, car il n'y avait aucune libération d'ARNm-EGFP lors de la migration sur le gel agarose, indiquant une bonne complexation (Figure 8A). Les nanoparticules formées pour différents rapports N/P (2:1, 3:1, 4:1, 10:1, 15:1) ont présenté une efficacité d'encapsulation de $95 \pm 1.3\%$ (Figure 8B), confirmant les résultats sur gel agarose.

Les nanoparticules ont été mesurées par DLS, donnant un diamètre hydrodynamique de $103,8 \pm 21,23$ nm et $140 \pm 26,8$ nm pour les rapports N/P de 3 :1 et 4 :1, respectivement, avec un indice de polydispersité de $0,34 \pm 0,035$ et $0,37 \pm 0,04$ (Figure 8C et 8D). Les mesures du potentiel ζ pour les ratios N/P de 3 et 4 étaient respectivement de $10 \pm 0,96$ mV et $9,3 \pm 0,2$ mV (Figure 8E).

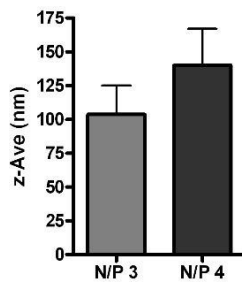
(A)



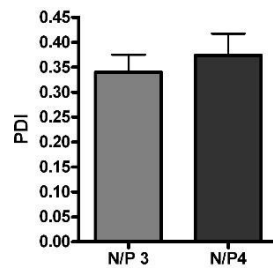
(B)



(C)



(D)



(E)

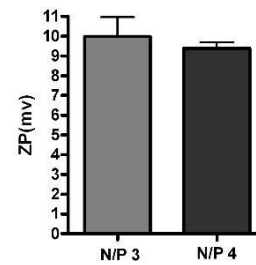


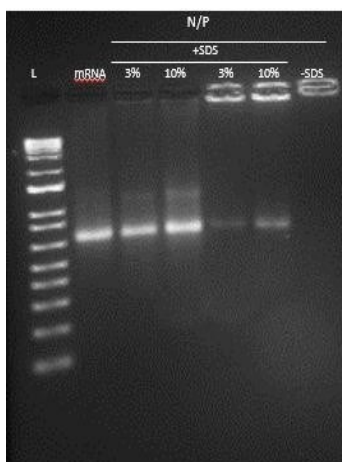
Figure 8. Caractérisation des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP. (A) Électrophorèse sur gel agarose des nanoparticules avec 1 μ g ARNm-EGFP/puit. Ligne 1: Ladder (1kb); ligne 2: ARNm-EGFP libre; lignes 3-8 montrent la formation des nanoparticules aux ratios N/P 2,3,4,5,10 et 15 respectivement. (B) Efficacité d'encapsulation de l'ARNm-EGFP aux ratios 2 :1, 3 :1, 4 :1, 5 :1, 10 :1 et 15 :1 (C), (D), (E) Taille, le PDI et le potentiel ζ pour les nanoparticules formées à une concentration de 3 μ g/ml aux ratios 3 :1 et 4 :1. Toutes les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes.

4.2 Libération de l'ARNm-EGFP des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP et analyse de la stabilité contre la dégradation enzymatique

Nous devons assurer que les nanoparticules formées soient stables et capables d'encapsuler complètement l'ARNm-EGFP, tout en permettant une libération réversible de celui-ci. Pour cela, nous avons opté pour l'utilisation de nanoparticules avec un rapport N/P de 3 :1 pour nos expériences prochaines.

Afin d'évaluer la résistance de l'encapsulation de l'ARNm-EGFP, nous avons effectué un test de déplacement en utilisant des polyanions tels que l'héparine et le SDS, ainsi que l'enzyme chitosanase. Les résultats obtenus à partir de la migration sur gel agarose ont révélé une libération totale de l'ARNm-EGFP lorsqu'une concentration de 3 et 10% de SDS a été utilisée avec chauffage à 50°C (Figure 9A). Cependant, nous n'avons observé aucune libération lorsque l'héparine ou l'enzyme chitosanase ont été utilisés, car les nanoparticules sont restées piégées dans les puits du gel agarose (Figure 9B).

(A) 1 2 3 4 5 6 7



(B) 1 2 3 4 5 6

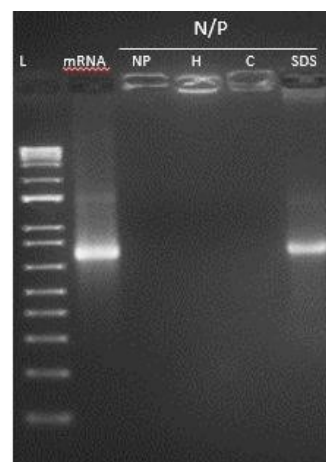
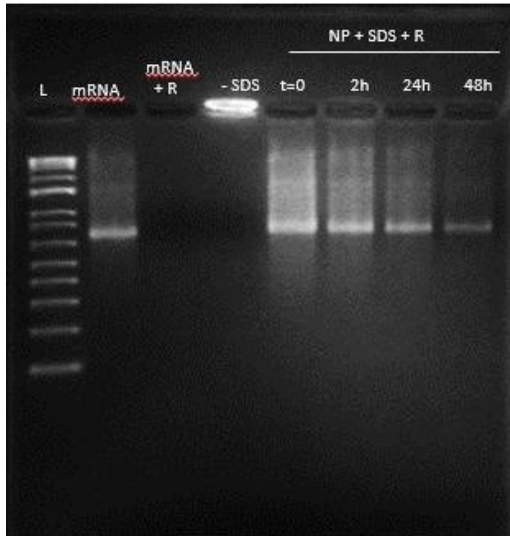


Figure 9. Libération de l'ARNm-EGFP des nanoparticules CH-DIPEA-PEG. **(A)** libération d'ARNm-EGFP à partir du vecteur CH-DIPEA-PEG sur gel agarose après incubation à différentes températures. Les lignes 3 et 4 montrent les nanoparticules formées à un ratio N/P de 3 :1 en présence de 3 et 10% SDS respectivement, chauffées à 50°C pendant 20 min. les lignes 5 et 6 montrent les mêmes nanoparticules formées à un ratio N/P 3 :1 en présence de 3 et 10% de SDS incubées à température ambiante pendant 20 min. La ligne 7 montre les mêmes nanoparticules sans SDS. **(B)** Libération de l'ARNm-EGFP du vecteur CH- DIPEA₅₃-PEG₁₋₁₅ à l'aide de l'enzyme chitosanase, solutions SDS et héparine. La ligne 3 montre les nanoparticules formées à un rapport N/P de 3:1. Les lignes 4, 5 et 6 montrent les mêmes nanoparticules incubées avec de l'héparine 1 mg/ml, chitosanase 5[mU/μl] et 3% SDS respectivement.

La protection de l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv contre la dégradation par la RNase A a été évaluée sur gel agarose et gel polyacrylamide (Figure 10A et 10B) respectivement. Le pourcentage de l'ARNm-gfpuv intact libéré des nanoparticules et quantifié à l'aide du Typhoon était de 92.93±1.8%, 88.43±0.69 %, 86.67±1.18 % et 81.07±1.6 % pour les temps d'incubation t=0, 2h, 6h et 24h respectivement. En revanche, et tel qu'attendu l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv libres ont été rapidement dégradés et n'étaient plus observés après une incubation de 2h avec la RNase A (Figure 10A, ligne 2) et (Figure 10B, ligne 2). Ces résultats confirment qu'un pourcentage élevé d'ARNm-EGFP et ARNm-gfpuv était complexé et encapsulé avec le CH-DIPEA₅₃-PEG₁₋₁₅, et que ces nanoparticules fournissaient une excellente protection contre la dégradation enzymatique.

(A)



(B)

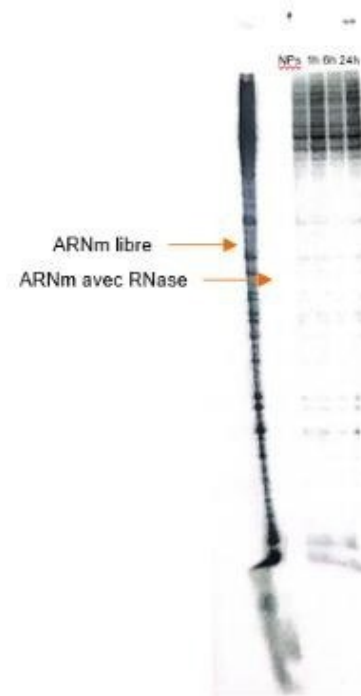


Figure 10. Évaluation de la résistance des nanoparticules contre la dégradation enzymatique. **(A)** Libération de l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv du vecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}. Analyse de l'état de conservation de l'ARNm-EGFP par électrophorèse sur gel agarose après incubation de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP avec de la RNase A. Ligne 1: Ladder (1kb); Ligne 2: ARNm-EGFP libre; Ligne 3: ARNm-EGFP avec RNase; Ligne 4: nanoparticules sans RNase et sans SDS; Ligne 5-8: ARNm libéré des nanoparticules à l'aide de SDS à 3% après incubation avec la RNase A pendant 0 min, 2h, 24h et 48h. **(B)** Analyse de l'état de conservation de l'ARNm-gfpuv marqué à [α -³²P] ATP après incubation de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-gfpuv avec la RNase A. Ligne 1 : ARNm-gfpuv libre; Ligne2 : ARNm-gfpuv avec RNase; Ligne 3 : ARNm-gfpuv libéré des nanoparticules à l'aide de SDS à 10%. Ligne 4, 5 et 6 : ARNm-gfpuv libéré des nanoparticules à l'aide de SDS à 10% après incubation avec la RNase A pendant 2h, 6h et 24h.

4.3 Viabilité cellulaire et toxicité

L'effet des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP et du CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} libre a été évalué sur trois types de cellules différents (Caco-2, RAW 264.7 et HEKa) en utilisant deux méthodes d'analyses distinctes : le test MTS a permis d'évaluer la viabilité cellulaire, tandis que le test LDH a permis de mesurer le niveau de LDH libéré, qui est un indicateur de la mort cellulaire. La concentration de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} choisie pour les deux tests était proportionnelle à la quantité d'ARNm-EGFP encapsulé. En d'autres termes, plus la quantité d'ARNm-EGFP augmentait, plus la quantité de vecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} augmentait, variant de 3.7 µg/ml pour 0.5 µg d'ARNm-EGFP à 29.75 µg/ml pour 4 µg d'ARNm-EGFP. Les concentrations de H₂O₂ choisies comme témoins positifs pour les RAW 264.7, Caco-2 et HEKa étaient respectivement de 2 mM, 4 mM et 500 µM. Après une exposition de 48 h, on a observé une diminution de plus de 50% de la viabilité cellulaire causée par H₂O₂. Dans le test LDH, 0.1% triton X-100 a servi comme témoin positif pour les trois types de cellules, montrant que 100% des cellules avaient libéré l'enzyme lactate déshydrogénase après 48h d'exposition.

Les cellules Caco-2 ont montré une meilleure viabilité cellulaire et un taux de LDH plus faible que les cellules RAW 264.7 et HEKa après incubation avec les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP et CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} libre. À la concentration la plus faible de 3.7 µg/ml de nanoparticules, la viabilité était de $98.58 \pm 8.1\%$ ($p < 0.01$) et le taux de LDH libéré était de $5.5 \pm 0.43\%$ ($p < 0.01$) (Figure 11A et 11B). Ces valeurs sont restées relativement constantes même aux concentrations les plus élevées testées, atteignant une viabilité de $95.13 \pm 8.5\%$ ($p < 0.01$) et un taux de LDH de $3.03 \pm 1.36\%$ ($p < 0.01$) à une concentration de 29.75 µg/ml. Pour les mêmes concentrations, le CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} libre a présenté un taux de viabilité de $98.46 \pm 5.2\%$ ($p < 0.01$) à 3.7 µg/ml et $92.6 \pm 5\%$ ($p < 0.01$) à 29.75 µg/ml ainsi qu'un taux de LDH de $3.43 \pm 1.43\%$ ($p < 0.01$) à 3.7 µg/ml et $6.21 \pm 1.63\%$ ($p < 0.01$) à 29.75 µg/ml.

Pour les RAW 264.7, la viabilité cellulaire est restée relativement élevée et constante pour toutes les concentrations de nanoparticules testées, variant de $91.52 \pm 4.25\%$ à $91.32 \pm 4.38\%$ pour $3.7 \mu\text{g/ml}$ et $29.75 \mu\text{g/ml}$ (Figure 11C). Bien que les résultats de MTS aient indiqué une viabilité élevée, les résultats de LDH ont également révélé des taux élevés de libération de LDH avec un taux de $88.57 \pm 0.94\%$ à $3.7 \mu\text{g/ml}$ et $88.22 \pm 3.3\%$ à $29.75 \mu\text{g/ml}$ (Figure 11D).

Les cellules HEKa ont montré une relation dose-dépendante avec les nanoparticules. En augmentant la concentration de nanoparticules, la viabilité cellulaire diminue de $97.65 \pm 4.3\%$ ($p < 0.01$) à $35.8 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) (Figure 11E). Parallèlement, le taux de LDH augmente avec la concentration, passant de $8.6 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) à $30.85 \pm 1.99\%$ ($p < 0.01$) pour les concentrations de $3.7 \mu\text{g/ml}$ et $29.75 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Pour le CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} libre, la viabilité cellulaire diminue de $77.23 \pm 4.38\%$ ($p < 0.01$) à $11.05 \pm 2.7\%$ ($p < 0.01$) et le taux de LDH augmente de $26.64 \pm 5.65\%$ ($p < 0.01$) à $56.9 \pm 1.23\%$ ($p < 0.01$) pour les concentrations de $3.7 \mu\text{g/ml}$ et $29.75 \mu\text{g/ml}$, respectivement (Figure 11F). En résumé, les résultats de ce test ont révélé que les concentrations de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP et CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} allant de $3.7 \mu\text{g/ml}$ à $29.75 \mu\text{g/ml}$ induisent une altération significative de la viabilité cellulaire après une période d'exposition de 48h selon les types cellulaires examinés. Néanmoins, nos nanoparticules respectent le seuil de viabilité pour ce test qui est $> 70\%$, selon la norme ISO 19007 :2018. En conséquence, dans le cadre de nos prochaines expériences, nous avons opté pour une concentration de $7.45 \mu\text{g/ml}$ de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}, laquelle est utilisée pour encapsuler $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ARNm-EGFP. Cette même concentration a également été employée lors de nos précédentes expériences, notamment pour la caractérisation et l'analyse de la stabilité. Dans le cadre de ce test spécifique, cette concentration a démontré une viabilité cellulaire de $99.58 \pm 8.18\%$ ($p < 0.01$), $92.66 \pm 4.57\%$ ($p < 0.01$) et $97.29 \pm 1.03\%$ ($p < 0.01$) pour les Caco-2, RAW macrophages 264.7 murins et les HEKa, respectivement.

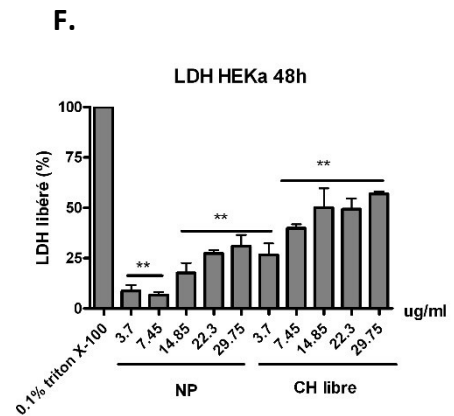
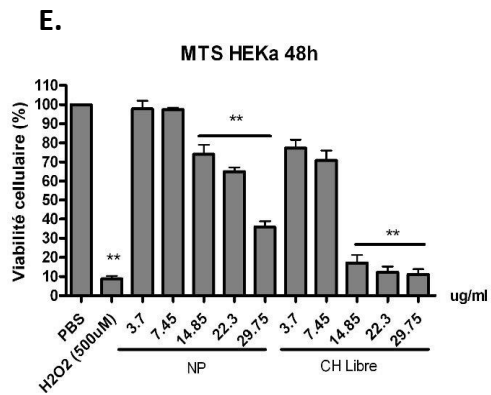
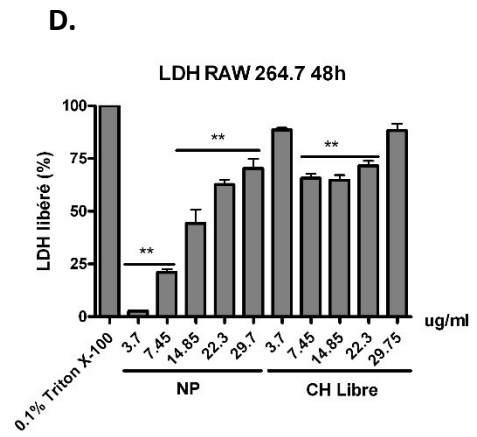
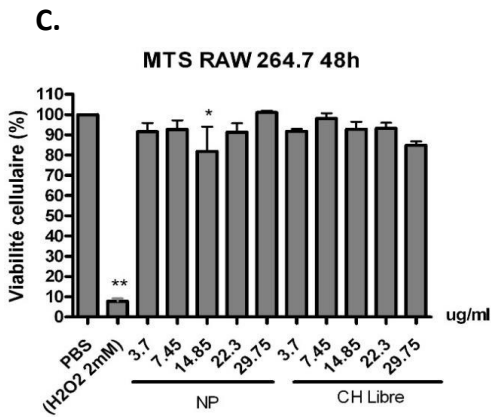
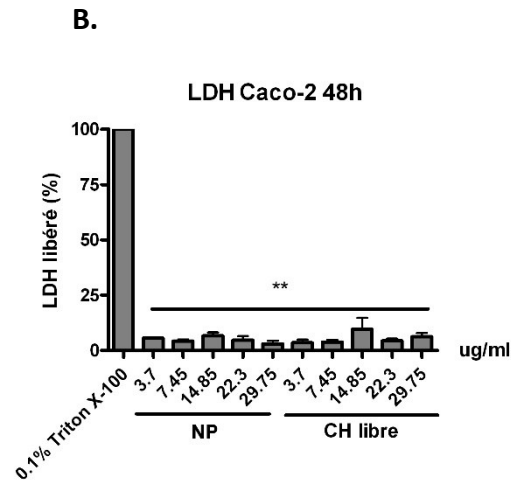
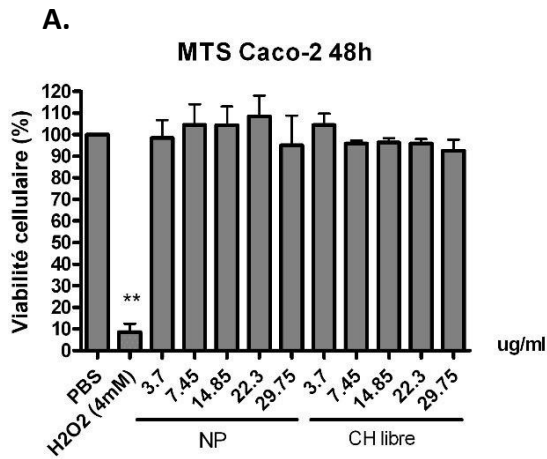


Figure 11. Viabilité cellulaire et toxicité des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP.

L'effet cytotoxique des nanoparticules et du chitosane libre à différentes concentrations ($\mu\text{g/ml}$) a été évalué à l'aide du test MTS et LDH dans les cellules Caco-2 (A et B), RAW 264.7 (C et D) et HEKa (E et F). Les cellules ont été incubées avec les échantillons pendant 48h à 37°C. Le PBS a été utilisé comme contrôle négatif. 4 mM, 2 mM et 500 μM d' H_2O_2 ont été utilisés comme contrôles positifs pour les RAW 264.7, Caco2 et HEKa, respectivement. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, sont significativement différents du contrôle négatif. Les données sont exprimées comme la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA à une voie (test post hoc de Dunnett).

4.4 Internalisation des nanoparticules CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15} /ARNm-EGFP-Cy5 dans les cellules et les compartiments endolysosomaux

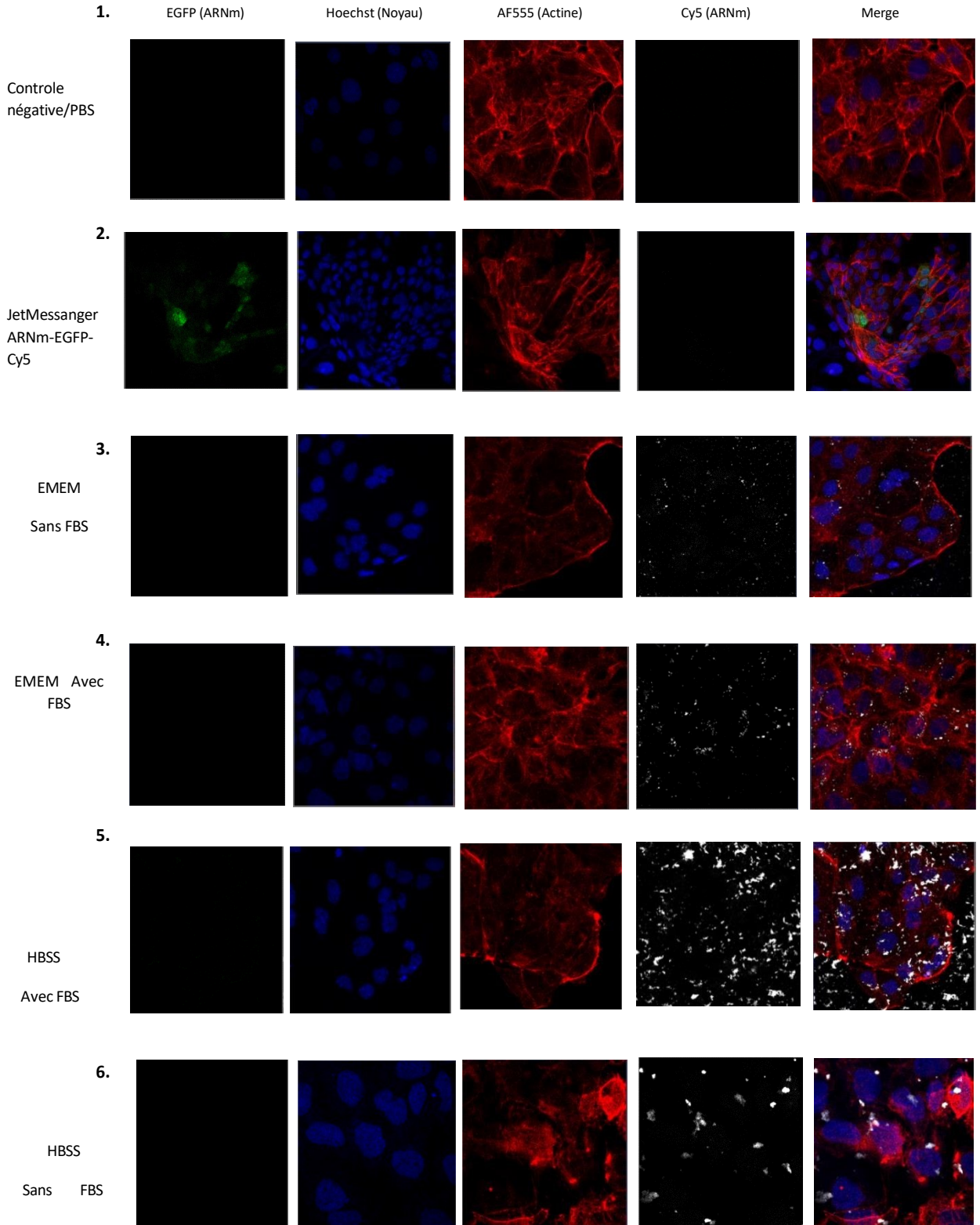
Après avoir réalisé une évaluation de la viabilité cellulaire ainsi que de la toxicité, la prochaine phase du projet implique l'examen de l'internalisation de nos nanoparticules dans les cellules Caco-2, RAW 264.7 et les cellules HEKa. En effet, pour que notre thérapie soit considérée comme efficace, il est essentiel que les nanoparticules puissent pénétrer à l'intérieur des cellules et traverser leur membrane cellulaire, afin d'assurer une efficacité maximale de leur action thérapeutique.

L'internalisation des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP-Cy5 (à une concentration de 7.45 $\mu\text{g/ml}$ pour le CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15} et 1 μg d'ARNm-EGFP-Cy5) dans les cellules Caco-2, RAW 264.7 et HEKa a été analysée qualitativement par microscopie confocale. Le coefficient de corrélation de Pearson's (PCC) a été utilisé pour évaluer la colocalisation des nanoparticules marquées au Cy5 avec l'actine, un composant important du cytosquelette de la cellule. Le PCC varie de -1

à 1, ou une valeur de 1 indique une colocalisation positive forte, une valeur de -1 indique une colocalisation négative forte, et une valeur proche de 0 indique une absence de colocalisation. Pour chaque type de cellule et pour leurs milieux spécifiques supplémentés ou non avec du FBS, la plupart des nanoparticules étaient regroupées près du noyau, avec un coefficient de corrélation variant entre 0.468 et 0.829 pour les milieux supplémentés en FBS (Figure 12A-4, 12B-4 et 12C-4) et entre 0.23 et 0.4 pour les milieux sans FBS (Figure 12A-3, 12B-3 et 12C-3). Pour les milieux HBSS avec ou sans FBS pour les trois types de cellules, la plupart des nanoparticules se trouvaient plutôt sous forme d'agrégats distribués dans le cytoplasme avec un coefficient de corrélation variant entre 0.14 et 0.2 pour les milieux HBSS avec FBS et entre 0.21 et 0.34 pour les milieux HBSS sans FBS. Le contrôle positif JetMessenger/ARNm-EGFP-Cy5 a permis d'exprimer la protéine EGFP dans tous les types de cellules (Figure 12A-2, 12B-2 et 12C-2) ce qui confirme la capacité de l'ARNm-EGFP à induire l'expression de la protéine EGFP lorsqu'il est transfecté de manière conventionnelle. Dans toutes les trois lignées cellulaires et pour chaque conditions de transfection testée, la protéine EGFP n'a pas été exprimée, ce qui était démontré par l'absence de signal vert. Cette observation était identique à notre groupe témoin négatif.

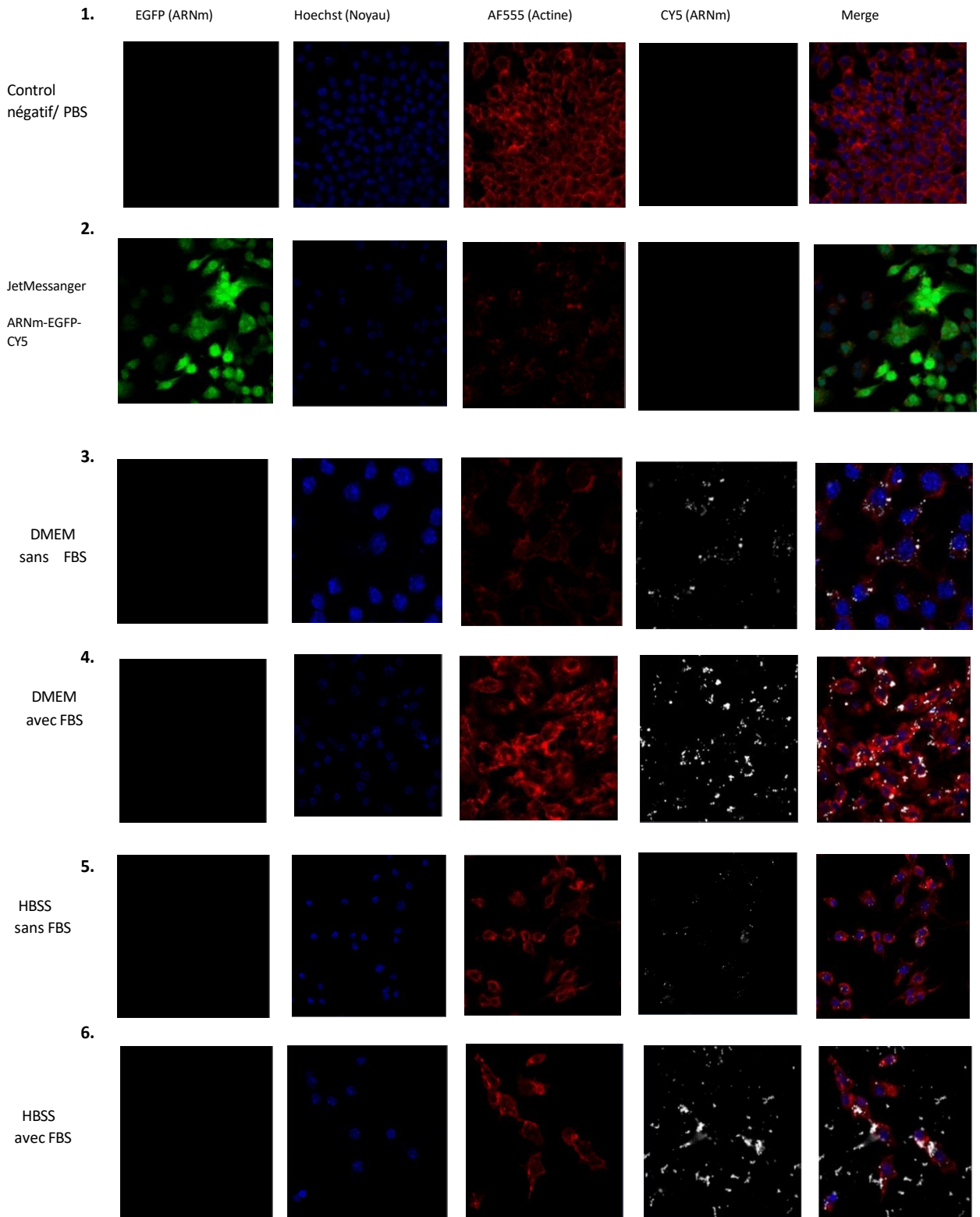
Caco-2

A



RAW macrophages 264.7

B



HEKa

C

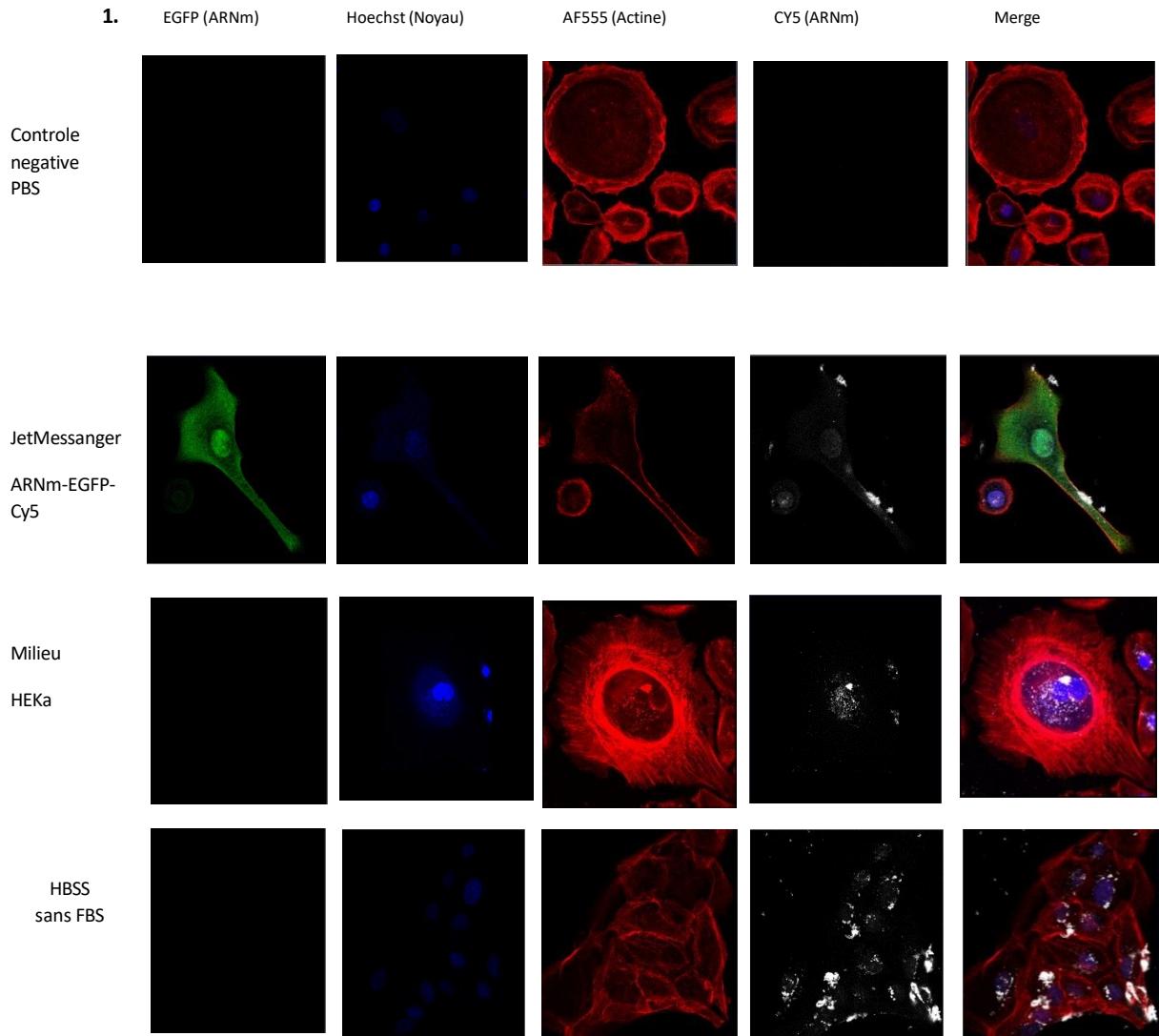
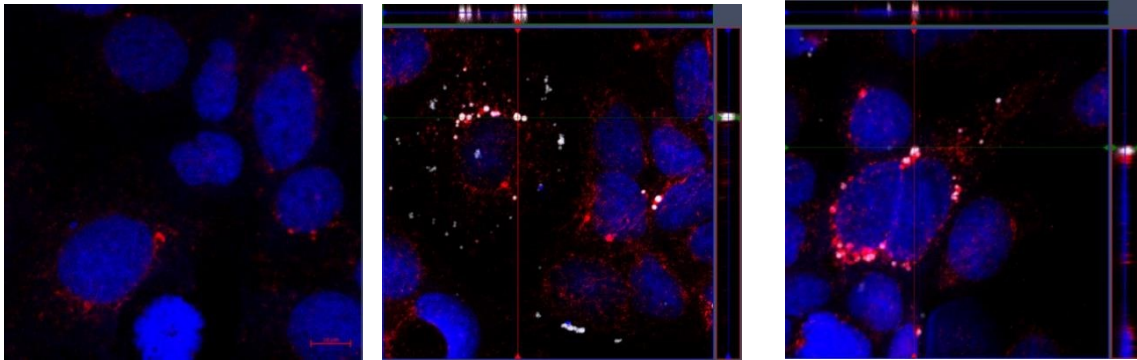


Figure 12. Transfection des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2), RAW macrophages 264.7 murins et kératinocytes épidermiques primaires (HEKa) avec les nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP-Cy5. Transfection des cellules Caco-2 **(A)**, cellules RAW macrophages 264.7 murins **(B)** et cellules HEKa **(C)**. Pour tous les types de cellules et chaque conditions testées, les cellules ont étéensemencées 24 h avant la transfection. 48 h après la transfection, les cellules ont été fixées avec 4% de formaldéhyde. Le cytosquelette a été coloré par la phalloïdine (rouge) et le noyau (bleu) par le Hoechst. Les nanoparticules sont visibles en blanc et la protéine EGFP en vert. Les images ont été prises par microscope confocal à balayage laser. Le groupe témoin négatif a été transfecté en utilisant une quantité de PBS remplaçant l'ARNm-EGFP.

Afin d'identifier la localisation endosomale des nanoparticules CH- DIPEA₅₃-PEG_{1.15} /ARNm-EGFP-Cy5, un test de colocalisation avec l'anticorps anti-LAMP-1 a été effectué sur les cellules Caco-2 et HEKa. Le milieu EMEM supplémenté avec 10% de FBS et le milieu de croissance des kératinocytes ont été choisis comme milieu de transfection pour les Caco-2 et HEKa, respectivement. Les nanoparticules étaient bien dispersées et localisées près du noyau, indiquant clairement que ces nanoparticules sont situées à l'intérieur des cellules, comme confirmé précédemment. L'analyse en mode Z-stack des images a clairement indiqué que certaines nanoparticules semblent échapper aux endolysosomes tandis que d'autres restent piégées dans ces compartiments. Les figures (13B et 13E) montrent que le signal Cy5 (en blanc) représentant les nanoparticules est à l'extérieur du contour lysosomal (en rouge), tandis que les figures (13C et 13F) montrent que le signal Cy5 est situé à l'intérieur du contour lysosomal (en rouge).

Caco-2

(A) PBS (B) Nanoparticules dans le cytoplasme (C) Nanoparticules dans les endolysosomes



HEKa

(B) PBS (E) Nanoparticules dans le cytoplasme (F) Nanoparticules dans les endolysosomes

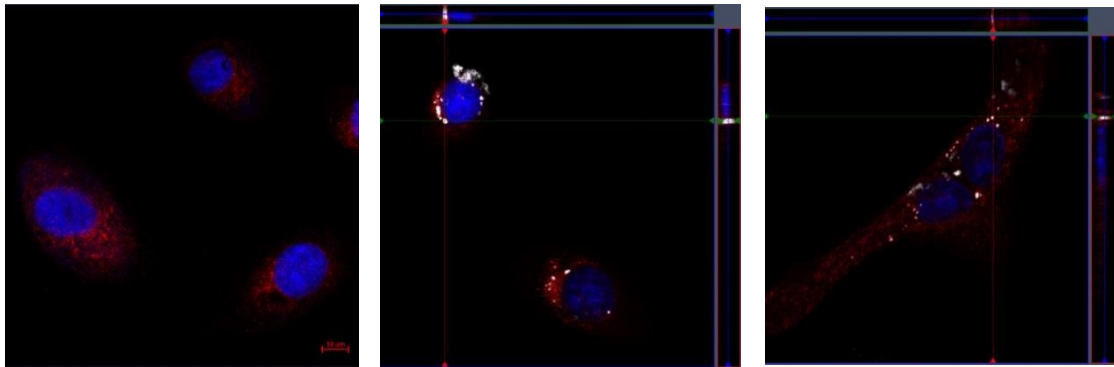


Figure 13. Localisation intracellulaire des nanoparticules CH-DIPEA-PEG/ARNm-EGFP-Cy5. Les nanoparticules ont été incubées avec les cellules Caco-2 et HEKa pendant 48h. Blanc : nanoparticules, rouge : membranes endolysosomales, bleu : noyau. Une vue latérale a été obtenue par microscopie confocale. **(A)** et **(D)** : Contrôle négatif (PBS) pour les cellules Caco-2 et HEKa respectivement. **(B)** et **(E)** Échappement des nanoparticules des compartiments endolysosomaux pour les cellules Caco-2 et HEKa respectivement. **(C)** et **(F)** Emprisonnement des nanoparticules dans les compartiments endolysosomaux.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Ces dernières années, la thérapie génique a suscité un vif intérêt en tant qu'approche thérapeutique pour traiter diverses maladies. L'utilisation de l'ARNm comme molécule thérapeutique a souvent été encouragée en raison de sa capacité à contourner les réglementations strictes de la thérapie génique qui s'appliquent à l'ADN, car il ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte (Wadhwa, et al., 2020). Cependant, il peut y avoir des débats sur la classification de la thérapie avec l'ARNm en tant que thérapie génique. Par exemple, en Europe, toute substance pharmaceutique active contenant ou composée d'un acide nucléique et administré aux êtres humains est soumise aux réglementations de la thérapie génique, tandis que cela ne s'applique pas aux États-Unis (Iglesias-Lopez et al., 2019)

L'utilisation de l'ARNm est confrontée à divers obstacles tels que la répulsion électrostatique avec la barrière cellulaire polyanionique et sa dégradation enzymatique, ce qui limite sa capacité à atteindre le cytoplasme pour une traduction efficace (Nitika Wei et Hui A, 2022). Pour surmonter ceci, plusieurs systèmes de livraison viraux et non viraux ont été développés.

Dans le contexte de la thérapie génique non virale, le chitosane est le vecteur le plus couramment utilisé en raison de sa facilité de synthèse, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité (Peniche H et Peniche C, 2011).

Pour cette étude, le CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} a été choisi comme vecteur pour transporter l'ARNm-EGFP dans trois lignées cellulaires différentes, à savoir Caco-2, HEKa et RAW 264.7. En plus de faciliter le transport, ce vecteur a été choisi pour protéger l'ARNm-EGFP contre la dégradation par les nucléases, dans le but d'induire l'expression de la protéine EGFP.

Les modifications chimiques apportées au chitosane sont essentielles, car malgré son utilisation répandue en tant que vecteur de transfection, il se heurte à des limitations liées à sa solubilité réduite et à son faible degré d'ionisation à pH neutre (Martinez Junior et al., 2022). Pour cette raison, l'hypothèse formulée est que le greffage du chitosane avec des groupes amines additionnels permet d'augmenter son degré d'ionisation à pH physiologique, ce qui favorise une meilleure interaction avec l'ARN et améliore son efficacité de transfection (Oliveira et al., 2013 ; de Souza et al., 2018). Dans ce contexte, l'idée de greffer le chitosane avec des groupes DIPEA s'est révélée intéressante, comme l'ont démontré les résultats d'une étude publiée par Giacomelli F., et al, ou l'utilisation de polycations synthétiques comportant des unités de méthacrylate de 2-(diisopropylamino)éthyle (DPA) dans leur structure a montré une grande sensibilité au pH dans le cadre d'application de livraison ciblée de médicaments pour le traitement des tumeurs (Giacomelli et al., 2011 ; Zhou et al., 2016). La structure de ces polycations synthétiques est similaire aux groupements DIPEA. De plus, les groupes DIPEA sont présents dans différents médicaments commercialisés tels que la disopyramide et la propanthéline, ce qui laisse également supposer que leur combinaison avec le chitosane serait non toxique (Martinez Junior et al., 2022).

En plus des modifications apportées avec les groupes DIPEA, l'incorporation de chaînes de PEG présente également des avantages en améliorant la durée de circulation du vecteur en évitant ses interactions avec différentes protéines (Blanco et al., 2015). Cependant, il convient de noter que le PEG, étant un polymère non biodégradable, nécessite une greffe de fraction réduite avec une masse moléculaire comprise entre 1.5 et 5 kDa. Ceci va permettre une élimination rapide par filtration glomérulaire (Du, B et al., 2019). Cependant, il est important de noter que les longues chaînes de PEG peuvent bloquer la liaison des nanovecteurs avec les récepteurs correspondants à la surface des cellules (Fang, Y. et al., 2017).

Notre équipe de recherche a synthétisé une série de chitosanes modifiés avec des groupes DIPEA₅₋₅₅ et PEG. Parmi ces nanovecteurs, nous avons sélectionné CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} qui contient 53% de DIPEA et 1.15% de PEG (2kDa) pour mener nos recherches. Pour cette étude trois lignées cellulaires ont été choisies comme modèles *in vitro*. Les HEKa ont été sélectionnés en raison de leur rôle essentiel lors du développement de nouvelles stratégies de vaccination par voie cutanée, étant le premier point de contact avec de nombreux antigènes (Gröne A, 2002). Des études ont démontré que les HEKa sont capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T, entraînant une réponse immunitaire (Black et al., 2007). Par ailleurs, les Caco-2 ont été fréquemment utilisées comme modèle de l'épithélium intestinal lors de l'administration de vaccins par voie orale (Kono et al., 2016). Elles ont été choisies pour représenter les entérocytes rencontrés par les nanoparticules lors de l'administration des vaccins par voie orale (Kono et al., 2016 ; Cao et al., 2020). Enfin, la lignée cellulaire RAW macrophages 264.7 a été utilisée comme modèle de cellules présentatrices d'antigènes (APC), jouant un rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T et la stimulation de la réponse immunitaire (Layek et al., 2015)

En utilisant le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}, nous avons pu obtenir des nanoparticules en le complexant avec l'ARNm-EGFP. Par la suite, nous avons procédé à la caractérisation et évalué leur stabilité afin de prédire leur interaction avec les cellules à l'intérieur d'un organisme vivant. Ensuite, nous avons mené des études *in vitro* pour examiner la toxicité et la capacité de transfection des nanoparticules.

5.1 Caractérisation physico-chimiques des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}-ARNm-EGFP

Dans la première phase de notre étude, nous avons cherché à démontrer la formation de complexes entre le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} et l'ARNm-EGFP, donnant ainsi naissance aux nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP. Pour visualiser cette formation, nous avons examiné les nanoparticules préparées à différents ratios N/P (2 :1, 3 :1, 4 :1, 5 :1, 10 :1, 15 :1) sur gel agarose. En effet, si les nanoparticules se forment, le nanovecteur empêche la libération de l'ARNm-EGFP sur le gel d'agarose et reste piégé dans le puits du gel ce qui illustre la combinaison complète de l'ARNm-EGFP avec le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} (Figure 8A). La figure 8A montre aussi que la complexation de l'ARNm-EGFP avec le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} est dépendante du ratio N/P. Seules les nanoparticules avec un ratio N/P supérieur à 2 :1 peuvent complètement complexé l'ARNm-EGFP.

La formation des nanoparticules a également été confirmée par un test d'encapsulation en utilisant le réactif RiboGreen, qui se lie à l'ARNm-EGFP libre mais pas lorsque l'ARNm-EGFP est encapsulé avec le nanovecteur (Yang et al. 2014). En effet, l'efficacité d'encapsulation est un paramètre important qui doit être évalué lors de la sélection des nanovecteurs conçu pour transporter et délivrer les biomolécules d'intérêts. Un nanovecteur devrait être capable de transporter et protéger la plus grande quantité possible de biomolécule à la cellule cible (Valente et al., 2021). Nos résultats montrent qu'à partir du ratio N/P 2 :1 nos nanoparticules ont une efficacité d'encapsulation de 95 ± 1.3%. Cette efficacité est due à la présence de nombreux groupes amine libres dans le nanovecteur, en plus des modifications apportées en rajoutant les groupes DIPEA, ce qui permet de condenser efficacement l'ARNm-EGFP (Babu et Ramesh, 2017).

Le nanovecteur a pour rôle de protéger l'ARNm-EGFP dans le milieu extracellulaire et de le livrer à l'intérieur des cellules pour obtenir un effet biologique. Par conséquent, il est important d'avoir une certaine balance entre la complexation et le désassemblage des

nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP. Pour cette raison nous avons choisis le ratio N/P 3 :1 pour nos expériences ultérieures.

Après leur administration, les nanoparticules présentes dans la circulation sanguine peuvent interagir avec les protéines sanguines, les composants du système immunitaire et les différents types de cellules à travers la membrane plasmique (Woolf Thomas et Benoît Roux, 1996). Cette interaction est principalement déterminée par leur caractéristiques physico-chimiques, telles que la taille et le potentiel ζ (Oh N et Park, 2014). La taille de nos nanoparticules, mesurée par DLS, était de $103,8 \pm 21,23$ nm pour N/P 3 :1. Ces résultats sont cohérents avec la taille rapportée par Martinez et al. (Martinez Junior et al., 2022), où il a démontré que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules CH-DIPEA₁₁₋₃₂-PEG_{2.6-3.3}/siRNA était inférieur à 200 nm pour un ratio N/P 5 :1. D'autre part, nos résultats semblent différer de la taille des nanoparticules CH- acide hyaluronique/ARNm obtenus par Lallana et al. (Lallana, E et al., 2017), qui variait entre 200 et 300 nm. Cela s'explique par le fait que la taille des nanoparticules est influencée par la taille moléculaire des acides nucléiques complexés (Bloomfield, 1997).

En général, la taille des nanoparticules joue un rôle important dans les voies d'internalisation des cellules. L'internalisation des nanoparticules se produit principalement par endocytose, où la membrane cellulaire s'invagine pour former des vésicules intracellulaires (Zhao et Stenzel, 2018). Les cellules eucaryotes utilisent quatre voies principales d'internalisation des nanoparticules : l'endocytose médiée par la clathrine/cavéole, la phagocytose, la macropinocytose et la pinocytose (de Almeida et al., 2021). La phagocytose dépend principalement de l'opsonisation des protéines et peut englober des nanoparticules de différentes tailles (Behzadi et al., 2017). En revanche, l'endocytose médiée par la clathrine/cavéole semble dépendre de la taille des nanoparticules. Les nanoparticules de taille comprise entre 20 et 40 nm sont internalisés par la voie cavéole, tandis que celles de taille comprise entre 100 et 150 nm empruntent la voie clathrine (Dos Santos et al., 2011). Les nanoparticules que nous utilisons ont un diamètre qui correspond à cette fourchette de taille. Une étude réalisée par Win, K.Y. et Feng, S. S. en 2005 a montré que l'internalisation de nanoparticules en polystyrène (PS)

dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon humain était plus efficace avec des nanoparticules de 100 nm par rapport à celles de tailles de 50, 200, 500 et 1000 nm.

Une autre étude menée par Ma, Z. et Lim, L.Y. en 2003 a montré que les nanoparticules fluorescentes de chitosane d'une taille de 400 nm étaient internalisées par la voie clathrine dans les cellules Caco-2. Pour une application des nanoparticules contenant des agents immunosuppresseurs dans le traitement de psoriasis, il a été constaté que les nanogels en chitine de petite taille était mieux internalisés par les cellules kératinocytes épidermiques humaines (Gomes et al., 2022). En plus de l'internalisation dans les cellules non phagocytaires, il a été constaté que l'internalisation des nanoparticules lipidiques dans les macrophages dépendait de leur taille (Oh et Park, 2014). En effet, les nanoparticules lipidiques d'une taille comprise entre 20 et 100 nm sont internalisées par les macrophages par la phagocytose médiée par les récepteurs du complément (Vonarbourg, A. et al., 2006). En revanche, les nanoparticules lipidiques de taille supérieure à 100 nm ont montré une meilleure efficacité d'internalisation (Chono et al., 2007). Il est important d'étudier l'internalisation des nanoparticules dans les cellules phagocytaires afin d'élaborer des nanoparticules capables d'éviter la réponse immunitaire (Oh et Park, 2014).

Les nanoparticules de CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP présentait un potentiel ζ de 10 ± 0.96 mV à un rapport N/P 3 :1. Une valeur positive du potentiel ζ peut indiquer que l'ARNm-EGFP a été totalement enveloppé par le nanovecteur à ratio N/P 3 : 1. La valeur du potentiel ζ détermine d'une part la stabilité de la suspension et d'autre part l'interaction des nanoparticules avec différentes biomolécules présentes dans les milieux biologiques et la membrane cellulaire (Lu et Gao, 2010). En effet, les suspensions à fort potentiel ζ (négatif ou positif) permettent aux forces de répulsion d'excéder les forces d'attraction, ce qui confère une plus grande stabilité à la suspension par rapport à celles ayant un faible potentiel ζ qui ont tendance à se flocculer (Gumustas et al., 2017).

Dans une étude menée par He, Chunbai et al. sur l'impact du potentiel ζ sur l'internalisation cellulaire, il a été démontré que les nanoparticules en chitosane modifiée avec de l'hydrochlorure ont montré une internalisation plus élevée que les nanoparticules à charge négative dans les cellules phagocytaires telles que les macrophages (He et al., 2010). Plusieurs études ont émis l'hypothèse que les nanoparticules à charge positive peuvent être internalisées plus rapidement que les nanoparticules à charge neutre ou négative, en raison de la charge négative de la membrane cellulaire (Bernfield et al., 1999). Ceci a été confirmée pour différentes nanoparticules, telles que les oxydes de fer superparamagnétiques, les nanoparticules de silice, les nanosphères et les nanoparticules polymériques, dans différents types de cellules (Zhao et al., 2018).

De plus, la modification de la surface des nanoparticules par l'ajout de poly(éthylène) glycol (PEG), peut prolonger leur temps de circulation dans le sang. Cependant, il est important de noter que malgré leur efficacité d'internalisation, les nanoparticules chargées positivement présentent généralement une cytotoxicité en raison de leur perturbation de la membrane cellulaire (Singha et al., 2011)

La capacité d'un nanovecteur à protéger son cargo contre la dégradation par les nucléases demeure une caractéristique essentielle pour assurer une délivrance génique efficace (Abdul Ghafoor Raja et al., 2015 ; Fihurka et al., 2018). En effet, l'ARNm doit être protégé de la digestion par les nucléases pour avoir une activité optimale dans les cellules. Dans notre étude, nous avons soumis nos nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP et CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-gfpuv à l'enzyme RNase A pendant une durée de 48h afin d'évaluer leur capacité de protection vis-à-vis de l'ARNm commercial (ARNm-EGFP) et de l'ARNm synthétisé *in vitro* (ARNm-gfpuv). Avant de réaliser ce test, nous avons cherché à libérer l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv du nanovecteur en utilisant différentes solutions notamment l'héparine, SDS et l'enzyme chitosanase. Ces solutions ont été choisies d'après la littérature en raison de leur propriété connue de libération de l'ARN. Le SDS, en tant qu'agent anionique, est capable de concurrencer avec les interactions électrostatiques entre l'ARNm et le chitosane

(Yang, Z et al., 2015). L'héparine est un polysaccharide riche en groupes sulfates, est capable de se lier à des molécules chargées positivement, comme le chitosane (Strand et al., 2010 ; Pilipenko et al., 2019 ; Heidari et al., 2021). La chitosanase a été utilisée en raison de sa capacité à dégrader spécifiquement le chitosane, elle agit en clivant les liaisons de chitosane ce qui entraîne sa dégradation et la libération de l'ARNm (Alameh et al., 2010). Cependant, nos résultats ont montré que seule la solution SDS a conduit à une libération totale de l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv du nanovecteur. En ce qui concerne l'héparine et la chitosanase, cela peut s'expliquer par une interaction insuffisante entre l'héparine et le chitosane empêchant une libération complète de l'ARNm, ainsi que par une possible altération de la spécificité de la chitosanase en présence de modifications chimiques sur le polymère (Kohrs et al., 2019). Le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} a démontré une capacité de protection contre la dégradation par l'ARNase A. Selon les résultats des figures 4A et 4B, l'ARNm-EGFP et l'ARNm-gfpuv non complexés ont été entièrement dégradés après 2 heures d'incubation avec l'ARNase A. En revanche, ces deux derniers sont restés intacts pendant 48 heures pour l'ARNm-EGFP et 24 heures pour l'ARNm-gfpuv.

Selon la littérature, la protection contre la dégradation enzymatique dépend du type de vecteurs utilisés pour complexer l'acide nucléique. Par exemple, les nanoparticules de chitosane-poly(L)arginine/siRNA avec un ratio CS/PLA/siRNA de 5 :0.5 :1 ont démontré une capacité de protection allant jusqu'à 6 heures en présence d'RNase (Plianwong et al., 2013). Pour une application dans l'immunothérapie du cancer, les nanoparticules de chitosane-Sélénium/ ARNm, ciblées par le folate, ont démontré une protection contre la dégradation enzymatique pendant une période allant jusqu'à 2 heures, tandis que l'ARNm-Folate seul a été dégradé en 2 heures (Maiyo et Singh., 2019).

5.2 Toxicité des nanoformulations : la toxicité des nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} est type cellulaire dépendante

Nous avons employé deux méthodes pour évaluer la cytotoxicité, à savoir le test MTS et LDH. Le test MTS mesure le métabolisme mitochondrial, qui est lié à la survie cellulaire, tandis que le test LDH évalue l'intégrité membranaire, associée à la toxicité. Ces évaluations ont été réalisées sur trois types de cellules : les cellules Caco-2, les RAW 264.7 et les cellules HEKa. Les concentrations de nanoparticules utilisées dans les essais de cytotoxicité sont généralement exprimées en masse par unité de volume ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (Kong et al., 2011). Les concentrations du nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} utilisées (de 3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 29.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) correspondent à la quantité d'ARNm-EGFP (de 0.5 μg à 4 μg) complexé pour former les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ ARNm-EGFP. Ces concentrations ont été choisies pour déterminer la concentration optimale permettant la transfection tout en minimisant la cytotoxicité.

Les résultats obtenus pour les cellules Caco-2 ont révélé une viabilité cellulaire élevée, avec un faible taux de libération de LDH, ce qui est en accord avec le test MTS. Ainsi, l'exposition aux nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ ARNm-EGFP n'a pas altéré la viabilité cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec plusieurs études de cytotoxicité utilisant des nanoparticules de chitosane synthétisées avec du tripolyphosphate (TPP) en contact avec les cellules Caco-2, qui ont une viabilité cellulaire supérieure à 80% pour des nanoparticules de chitosane d'une taille de 126 à 1000 nm (Frigaard et al., 2022). L'étude menée par Loh et al. (2012) a également démontré que les cellules Caco-2 sont capables de se régénérer après une période d'incubation de 48 heures avec des nanoparticules à base de chitosane. Les résultats ont révélé une augmentation de la viabilité cellulaire de 30% à 80% dans le cas des cellules Caco-2 (Loh et al., 2012). Certaines études ont indiqué que la cytotoxicité des nanoparticules de chitosane en contact avec les cellules Caco-2 dépend principalement de leur taille plutôt que de leur potentiel ζ (Loh et al., 2012 ; Frigaard et al., 2022). Les nanoparticules de taille inférieure à 200 nm peuvent

présenter un effet cytotoxique en raison de leur facilité d'internalisation dans les cellules Caco-2 (Rejman et al., 2004), ce qui pourrait expliquer le faible taux de LDH observé (Figure 5).

Les RAW 267.4 ont montré une viabilité élevée avec un taux de LDH élevé pour toutes les concentrations testées, que ce soit pour les nanoparticules ou pour le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} libre. La viabilité élevée peut s'expliquer par un profil de faible toxicité de nos nanoparticules. Ces résultats concordent avec l'étude de Martinez et al. (2018), qui a démontré des viabilités supérieures à 80% pour des concentrations de 0.02 à 0.5 g/L de polymères CH-DIPEA₁₆-PEG_{3.3} et CH-DIPEA₃₂-PEG_{1.3}-

2.6, ainsi que pour leurs nanoparticules conjuguées avec du siRNA, évaluées chez les macrophages RAW 264.7 murins. Cependant, le taux élevé de LDH contredit les résultats du test MTS. Cela peut s'expliquer par des dommages cellulaires réversibles, c'est-à-dire que l'interaction entre les nanoparticules et la membrane cellulaire entraîne la libération de l'enzyme LDH, mais cela ne signifie pas nécessairement un processus irréversible de mort cellulaire. Les cellules peuvent présenter temporairement des altérations dans sa membrane sans induire la mort cellulaire (Chen et al., 2009; Fröhlich 2012 ; Contini et al., 2018). Une autre explication peut être attribuée à la nature des deux tests effectués. Bien que les tests MTS et LDH soient complémentaires, le test MTS mesure spécifiquement l'activité mitochondriale. Cela signifie que même si on observe une libération de LDH due à des altérations de la membrane causées par les nanoparticules, les mitochondries restent fonctionnelles et permettent toujours la conversion du substrat MTS en produit Formazan, qui peut ensuite être détecté par spectroscopie (Chen, 2013).

Les résultats de cytotoxicité trouvés dans la littérature concernant l'utilisation de polymères en chitosane modifié ciblant les macrophages RAW 264.7 murins pour la délivrance d'oligonucléotides et d'acides nucléiques concordent avec nos résultats. Par exemple, l'utilisation de nanoparticules de chitosane mannosylé pour la délivrance d'ARNm ciblant les macrophages a montré une viabilité supérieure à 75% à une concentration de plus de 10 µg/ml (Shilakari Asthana et al., 2014). De même, l'utilisation

de nanoparticules modifiées avec du carboxyméthyl dextran et du polyéthylèneimine pour la délivrance d'anti-HIV siRNA a donné une viabilité cellulaire de 93% pour les macrophages RAW 264.7 murins à une concentration de 30 µg/ml (Mobarakeh et al., 2019).

Pour les cellules HEKa, nous avons observé une réponse dose-dépendante entre la cytotoxicité et l'exposition aux nanoparticules. Plus la concentration de nos nanoparticules de charge positive augmente, moins la viabilité cellulaire est élevée et plus le taux de LDH est élevé. Les nanoparticules de charge positive présentent une affinité pour la membrane cellulaire chargée négativement. A des concentrations élevées, elles ont une affinité accrue pour la membrane cellulaire, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité membranaire, une libération importante de l'enzyme LDH et une fuite de molécules intracellulaires (Fröhlich, 2012 ; Zhao et al., 2018). De plus, la nature des cellules utilisées dans cette expérience peut expliquer cette observation. Les cellules HEKa sont des cellules épidermiques primaires et ne sont pas considérées comme une lignée cellulaire immortalisée. Les cellules primaires ont des caractéristiques cellulaires plus proches des cellules d'origine et sont donc plus susceptibles aux nanoparticules. De plus, les cellules primaires se différencient plus lentement que les cellules immortalisées, ce qui peut diminuer leur capacité à éliminer les nanoparticules et augmenter leur accumulation et leur toxicité (Kaur et Dufour 2012 ; Michael et al., 2021).

En résumé, il est important de prendre en compte plusieurs paramètres avant de réaliser des tests de cytotoxicité, car ils peuvent influencer les résultats. Ces paramètres comprennent le type de cellules utilisées, les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et la méthode utilisée pour évaluer la cytotoxicité. Dans notre étude, les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ ARNm-EGFP ont montré une faible cytotoxicité vis-à-vis des cellules Caco-2, une cytotoxicité variable vis-à-vis des macrophages RAW 264.7 murins et une cytotoxicité dose-dépendante vis-à-vis des cellules HEKa. Par conséquent, pour les trois types cellulaires, la concentration de 7.45 µg/ml a montré un faible profil de toxicité pour leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques.

5.3 Les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP s'internalisent mais n'induisent pas d'effet biologique

Dans notre étude préliminaire, nous avons voulu évaluer l'effet biologique de nos nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15}/ARNm-EGFP en utilisant des quantités d'ARNm-EGFP de 1 µg et 2 µg. Les résultats obtenus ont révélé l'absence de coloration verte, ce qui indique l'absence de production de protéines dans les trois lignées cellulaires testées, à savoir Caco-2, les RAW 264.7 et les cellules HEKa. Cette observation a été réalisée à l'aide de la microscopie à fluorescence (données non présentées).

Suite à ces résultats, une question s'est posée quant à la possibilité d'internalisation de nos nanoparticules. En effet, l'absence d'internalisation ne permettrait pas la libération de l'ARNm-EGFP et donc la production de protéines. Pour répondre à cette interrogation, nous avons décidé d'utiliser un ARNm-EGFP marqué avec du Cy5 afin de visualiser nos nanoparticules. Parallèlement, nous avons testé plusieurs conditions de transfection dans des milieux de cultures spécifiques à chaque type de cellules, en présence ou en l'absence de FBS, ainsi que dans du HBSS supplémenté ou non avec du FBS. L'exclusion de FBS dans le milieu de culture s'inscrit dans le concept de privation de sérum, qui consiste à faire croître les cellules dans un milieu de culture sans sérum ou réduit en sérum (Pirkmajer et Chibalin, 2011). En effet, il est souvent recommandé d'effectuer la transfection dans un milieu de culture sans sérum ou réduit en sérum, car les protéines présentes dans le sérum peuvent entrer en compétition avec les nanoparticules pour les récepteurs présents à la surface des cellules, empêchant leur internalisation dans les cellules (Rashid et Coombs, 2019). De plus, l'utilisation du HBSS suit la même logique de privation de sérum. Il est bien établi que l'incubation des cellules dans du HBSS induit une réponse autophagique en raison de la privation de nutriments (Mejlvang et al., 2018). Ainsi, l'absence de nutriments dans du HBSS favorise une endocytose plus efficace pour l'acquisition de nutriments, ce qui entraîne une internalisation plus efficace de nos nanoparticules (Song W et al., 2022). En d'autres termes, le choix d'utiliser des

milieux de culture supplémentés ou non avec du FBS ainsi que l'utilisation du HBSS supplémenté ou non avec du FBS vise à optimiser nos conditions de transfection pour obtenir les résultats souhaités.

Après la transfection, les cellules ont été observées à l'aide du microscope confocal, qui permet de générer des images en sections optiques fines en donnant des informations tridimensionnelles sur la localisation des nanoparticules à l'intérieure de la cellule (St. Croix et al., 2005). Les images obtenues par microscopie confocale révèlent la présence de nanoparticules de couleur blanche. En comparant ces images avec notre contrôle négatif de transfection contenant uniquement l'ARNm-EGFP-Cy5, nous avons observé qu'après 48h de transfection, aucune couleur blanche n'était visible, ce qui suggère une probable dégradation enzymatique de l'ARNm-EGFP-Cy5 (données non présentées). Par conséquent, nous supposons que la couleur blanche observée dans les autres images de microscopie confocale correspond au nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1,15} complexé avec l'ARNm-EGFP-Cy5. La microscopie confocale a confirmé que les nanoparticules CH-DIPEA₅₃-PEG_{1,15}/ARNm-EGFP-Cy5 étaient internalisées dans les trois lignées cellulaires testées. Cependant, il a été observé que dans les cellules transfectées avec du HBSS, les nanoparticules étaient présentes sous forme agrégée et la plupart n'étaient pas internalisées. Ceci peut être expliqué par la formation d'un précipité non soluble entre les ions calcium présents dans la solution HBSS et les ions phosphate présents la solution stock du polyplexe CH-DIPEA₅₃-PEG_{1,15}/ARNm-EGFP-Cy5. En effet, le polyplexe présente des sites de liaison pour les ions calcium présents dans la solution HBSS, ce qui entraîne la formation d'un réseau d'ions de phosphate de calcium cristallins blancs.

Après ces observations, une autre question s'est posée quant à la capacité de nos nanoparticules à échapper des endolysosomes ce qui pourrait être la raison d'absence de l'effet biologique, pour cela un test de colocalisation avec l'anticorps anti-LAMP-1 a été effectué sur les cellules Caco-2 et HEKa. Les protéines transmembranaires de type LAMP-1 se trouvent sur la membrane limitante du lysosome (Wartosch, et al., 2015). Cette protéine est présente à la fois dans les lysosomes et les endosomes tardifs (Lee et Ye., 2018). La fusion du lysosome avec

l'endosome tardif donne un endolysosome qu'on pourra visualiser à l'aide du test de colocalisation avec l'anti-LAMP-1.

Les résultats des images en Z-stack révèlent à la fois une colocalisation et une non-colocalisation entre le signal de la protéine fluorescente LAMP-1 (en rouge) et le signal des nanoparticules (en blanc) dans les lignées cellulaires Caco-2 et HEKa. La possible non-colocalisation indiquerait un échappement endosomique, grâce au chitosane qui provoque la rupture des endolysosomes par un processus appelé l'effet de l'éponge à protons (Malatesta et al., 2015). Lorsque les polyplexes pénètrent dans les cellules par endocytose, ils résident dans les vésicules endosomales. Une fois ces vésicules arrivées à maturation, les pompes à protons V-ATPase liées à la membrane transportent les protons H⁺ à l'intérieur du compartiment endolysosomal. Étant donné que le chitosane a une capacité tampon élevée, il accepte les protons et est accompagné par l'entrée d'ions chlorure Cl⁻ entraînant ainsi une accumulation de pression osmotique à travers la membrane, ce qui fait gonfler le compartiment endolysosomal et provoque sa rupture avec la libération du contenu dans le cytosol (Smith et al., 2018, Vermeulen et al., 2018).

Une étude menée par Plapied, L et al sur l'utilisation de nanoparticules de chitosane fongique pour l'administration orale de l'ADN a démontré une efficacité de transfection élevée dans les cellules Caco-2, ainsi qu'une capacité de ces nanoparticules à échapper aux compartiments endosomals, permettant ainsi à l'ADN d'atteindre le noyau cellulaire (Plapied et al., 2010). De plus, il a été démontré que les nanoparticules de chitosane conjuguées à l'acide hyaluronique échappent entièrement aux lysosomes dans les lignées cellulaires conjonctivales (Aibani et al., 2021).

Cependant, malgré une bonne protection contre la dégradation enzymatique, une internalisation réussie et un échappement endosomique de l'ARNm, il peut arriver qu'aucun effet biologique ne soit observé. Une explication possible est une non-dissociation entre le nanovecteur CH-DIPEA₅₃-PEG_{1.15} et l'ARNm-EGFP-Cy5. Normalement après l'échappement endosomique, la plupart de l'ARNm est facilement accessible dans le cytosol sans une liaison excessive au vecteur qui empêche sa traduction. Dans notre

étude, cette forte liaison est confirmée par nos résultats qui ont montré une efficacité d'encapsulation élevée avec une difficulté de relargage en utilisant de 3% à 10% de solution SDS, ce qui est très élevé par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature. Par conséquent, cette non-dissociation peut entraîner la formation d'un complexe trop stable, empêchant ainsi l'ARNm-EGFP-Cy5 d'être accessible aux ribosomes pour la traduction en protéines. Cette hypothèse a été confirmée par une étude menée par Jiang, Y., Lu et al. (2020), où ils ont incubé des polyplexes dans un système de traduction *in vitro* qui imite l'environnement cytosolique. Les résultats ont montré que les polyplexes présentant une forte efficacité d'encapsulation présentaient une traduction très lente, voire nulle. En revanche, les polyplexes avec une efficacité d'encapsulation plus faible semblaient montrer des taux plus élevés de traduction *in vitro* (Jiang et al., 2020).

CHAPITRE 6 Conclusion et Perspective

La recherche dans le domaine de l'amélioration des systèmes de livraison pour la thérapie génique non virale connaît une croissance constante. Les principaux défis associés à cette technologie concernent principalement la stabilité des nanoparticules, la protection de l'acide nucléique contre la dégradation enzymatique, ainsi que la capacité à transfecter efficacement les cellules cibles tout en induisant l'effet biologique souhaité. Notre projet a partiellement confirmé nos hypothèses de recherche initiales tout en parvenant à certains objectifs. En effet, nos nanoparticules se sont révélées stables tout en préservant l'ARNm contre la dégradation par les nucléases. De plus, elles ont démontré une bonne efficacité de transfection avec une faible toxicité, dans la plage de concentration choisie pour la transfection. Selon nos résultats, une hypothèse possible pour obtenir une expression protéique serait de réduire le pourcentage de DIPEA, ce qui entraînerait une diminution des groupes amines. Cette diminution de groupes amines conduirait à une réduction d'interaction entre l'acide nucléique et le polymère. Cependant, il est nécessaire de réaliser d'autres études de stabilité pour déterminer un équilibre entre la capacité de protection du polymère et la force d'interaction entre le polymère et l'ARNm. Pour soutenir cette hypothèse, notre équipe de recherche a synthétisé du chitosan avec un taux de 3% et 5% de DIPEA, dans le but d'encapsuler du siARN-GAPDH. Ce dernier a pour fonction d'inhiber l'expression du gène GAPDH, qui est responsable de la dégradation du glucose. Les résultats ont indiqué une forte inhibition de l'expression génique. Cependant, en raison de contraintes de temps et du cadre limité d'une maîtrise, l'échantillon en question n'a pas pu être soumis à des tests et à une optimisation pour l'ARNm.

Références bibliographiques

Abdul Ghafoor Raja, Maria, Haliza Katas, and Thum Jing Wen. "Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers." *PloS one* 10.6 (2015): e0128963.

Abramson, A., Kirtane, A. R., Shi, Y., Zhong, G., Collins, J. E., Tamang, S., ... & Traverso, G. (2022). Oral mRNA delivery using capsule-mediated gastrointestinal tissue injections. *Matter*, 5(3), 975-987.

Aghebati-Maleki, A., Dolati, S., Ahmadi, M., Baghbanzhadeh, A., Asadi, M., Fotouhi, A., ... & Aghebati-Maleki, L. (2020). Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of cellular physiology*, 235(3), 1962-1972.

Aibani, N., Rai, R., Patel, P., Cuddihy, G., & Wasan, E. K. (2021). Chitosan nanoparticles at the biological interface: Implications for drug delivery. *Pharmaceutics*, 13(10), 1686.

Alameh, M., Jean, M., DeJesus, D., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2010). Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *International journal of nanomedicine*, 473-481.

Alberer, M., Gnad-Vogt, U., Hong, H. S., Mehr, K. T., Backert, L., Finak, G., ... & von Sonnenburg, F. (2017). Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *The Lancet*, 390(10101), 1511-1520.

Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A., & Cervera, R. (2013). Autoimmunity: from bench to bedside [Internet].

Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256.

- Babu, A., & Ramesh, R. (2017). Multifaceted applications of chitosan in cancer drug delivery and therapy. *Marine drugs*, 15(4), 96.
- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 787-796.
- Banerji, I., Bhattacharjee, S., Mukherjee, K., & Bhattacharyya, S. N. (2023). RNA Vaccines: The Evolution, Applications, and the Challenges Ahead. In *Nucleic Acid Biology and its Application in Human Diseases* (pp. 349-364). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Bansal, M. (2003). DNA structure: Revisiting the Watson–Crick double helix. *Current Science*, 1556-1563.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences*, 69, 3613-3634.
- Baum, C., Von Kalle, C., Staal, F. J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., ... & Williams, D. A. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Molecular Therapy*, 9(1), 5-13.
- Behr, J. P. (1997). The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, 51(1-2), 34-34.
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., ... & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical society reviews*, 46(14), 4218-4244.
- Belongia, E. A., & Naleway, A. L. (2003). Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clinical medicine & research*, 1(2), 87-92.
- Benteyn, D., Heirman, C., Bonehill, A., Thielemans, K., & Breckpot, K. (2015). mRNA- based dendritic cell vaccines. *Expert review of vaccines*, 14(2), 161-176.

Berg, K., Kristian Selbo, P., Prasmickaite, L., Tjelle, T. E., Sandvig, K., Moan, J., ... & Høgset, A. (1999). Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research*, 59(6), 1180-1183.

Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T., & Rollings, J. E. (1993). Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. *Carbohydrate Research*, 238, 11-26.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 729-777.

Bertrand, E. et al. Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. (Camb)*. 47, 12547–9 (2011).

Black, A. P., Ardern-Jones, M. R., Kasprovicz, V., Bowness, P., Jones, L., Bailey, A. S., & Ogg, G. S. (2007). Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *European journal of immunology*, 37(6), 1485-1493.

Blakney, A. K., Ip, S., & Geall, A. J. (2021). An update on self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines*, 9(2), 97.

Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941-951.

Bloomfield, V. A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 44(3), 269-282.

Bonehill, A., Tuyraerts, S., Van Nuffel, A. M., Heirman, C., Bos, T. J., Fostier, K., ... & Thielemans, K. (2008). Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA. *Molecular Therapy*, 16(6), 1170-1180.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297-7301.

Brachet, J. (1942). La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement. *Archs. Biol.*, 53, 207-257.

Brito, L. A., Chan, M., Shaw, C. A., Hekele, A., Carsillo, T., Schaefer, M., ... & Geall, A. J. (2014). A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Molecular Therapy*, 22(12), 2118-2129.

Broos, K., Van der Jeught, K., Puttemans, J., Goyvaerts, C., Heirman, C., Dewitte, H., ... & Breckpot, K. (2016). Particle-mediated intravenous delivery of antigen mRNA results in strong antigen-specific T-cell responses despite the induction of type I interferon. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5.

Burnette, W. N. (1991). Recombinant subunit vaccines. *Current opinion in biotechnology*, 2(6), 882-892.

Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. E. (2017). Chapter 11—vaccines and vaccination. *Fenner and White's Medical Virology*, 5th ed.; Academic Press: London, UK, 155-167.

Bus, T., Traeger, A., & Schubert, U. S. (2018). The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(43), 6904-6918.

Bushman, F. D. (2020). Retroviral insertional mutagenesis in humans: evidence for four genetic mechanisms promoting expansion of cell clones. *Molecular Therapy*, 28(2), 352-356.

Cabral, H., Nakanishi, M., Kumagai, M., Jang, W. D., Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2009). A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharmaceutical research*, 26, 82-92.

Calabro, S., Tritto, E., Pezzotti, A., Taccone, M., Muzzi, A., Bertholet, S., ... & Seubert, A. (2013). The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*, 31(33), 3363-3369.

Cannarozzi, G., Schraudolph, N. N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M. T., Roth, A. C., ... & Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 141(2), 355-367.

Canton J (2018) Macropinocytosis: new insights into its underappreciated role in innate immune cell surveillance. *Front Immunol* 9:2286

Cao, P., Han, F. Y., Grøndahl, L., Xu, Z. P., & Li, L. (2020). Enhanced oral vaccine efficacy of polysaccharide-coated calcium phosphate nanoparticles. *ACS omega*, 5(29), 18185-18197.

Caspersson, T., & Schultz, J. (1939). Pentose nucleotides in the cytoplasm of growing tissues. *Nature*, 143(3623), 602-603.

Chan, F. K. M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*, 65-70.

Chandy, T., & Sharma, C. P. (1990). Chitosan-as a biomaterial. *Biomaterials, artificial cells and artificial organs*, 18(1), 1-24.

Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature reviews Drug discovery*, 20(11), 817-838.

Chen, C. Y. A., & Shyu, A. B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in biochemical sciences*, 20(11), 465-470.

Chen, J., Guo, Z., Tian, H., & Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3.

Chen, J., Hessler, J. A., Putchakayala, K., Panama, B. K., Khan, D. P., Hong, S., ... & Orr, B. G. (2009). Cationic nanoparticles induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes. *The journal of physical chemistry B*, 113(32), 11179-11185.

Chen, N. et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life* 69, 297–304 (2017).

Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F. H., & Qoronfleh, M. W. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res.* 2019; 23: 20.

Choi, Y. S., Lee, M. Y., David, A. E., & Park, Y. S. (2014). Nanoparticles for gene delivery: therapeutic and toxic effects. *Molecular & cellular toxicology*, 10(1), 1-8.

Chono, S., Tanino, T., Seki, T., & Morimoto, K. (2007). Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(1), 75-80.

Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, 63-70.

Coffey, J. W., Gaiha, G. D., & Traverso, G. (2021). Oral biologic delivery: advances toward oral subunit, DNA, and mRNA vaccines and the potential for mass vaccination during pandemics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 61, 517-540.

Contini, C., Schneemilch, M., Gaisford, S., & Quirke, N. (2018). Nanoparticle–membrane interactions. *Journal of Experimental Nanoscience*, 13(1), 62-81.

Coolen, A. L., Lacroix, C., Mercier-Gouy, P., Delaune, E., Monge, C., Exposito, J. Y., & Verrier, B. (2019). Poly (lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation. *Biomaterials*, 195, 23-37.

Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R. A., ... & Graham, B. S. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 586(7830), 567-571.

Crick, F. H. (1958, January). On protein synthesis. In *Symp Soc Exp Biol* (Vol. 12, No. 138-63, p. 8).

Crommelin, D. J., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (Eds.). (2013). *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.

Dai, X., Xiong, Y., Li, N., & Jian, C. (2019). Vaccine types. In *Vaccines-the history and future*. IntechOpen.

Daniali, M., Mousavi, T., & Abdollahi, M. (2022). *Biological products in medicine*.

Davitt, C. J., & Lavelle, E. C. (2015). Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Advanced drug delivery reviews*, 91, 52-69.

de Almeida, M. S., Susnik, E., Drasler, B., Taladriz-Blanco, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 50(9), 5397-5434.

de Ilarduya, C. T., Sun, Y., & Düzgüneş, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European journal of pharmaceutical sciences*, 40(3), 159-170.

de Souza, R. H. F. V., Dalla Picola, I. P., Shi, Q., Petrônio, M. S., Benderdour, M., Fernandes, J. C., ... & Tiera, M. J. (2018). Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. *International journal of biological macromolecules*, 119, 186-197.

Degors, I. M., Wang, C., Rehman, Z. U., & Zuhorn, I. S. (2019). Carriers break barriers in drug delivery: endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors. *Accounts of chemical research*, 52(7), 1750-1760.

Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., & Cheng, G. (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 2604-2621.

Desmet, C. J., & Ishii, K. J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 479-491.

DeVita Jr, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643-8653.

Devoldere, J., Dewitte, H., De Smedt, S. C., & Remaut, K. (2016). Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger. *Drug discovery today*, 21(1), 11-25.

Diebold, S. S. et al. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur. J. Immunol.* 36, 3256–3267 (2006).

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., ... & Vorstenbosch, C. V. D. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 21(1), 15-23.

Dolgin, E. (2021). The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*, 597(7876), 318-324.

Domard, A. pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: Application to Cull-polymer interactions. *Int. J. Biol. Macromol.* 1987, 9, 98–104

Dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2011). Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PloS one*, 6(9), e24438.

Du, B., Jiang, X., Huang, Y., Li, S., Lin, J. C., Yu, M., & Zheng, J. (2019). Tailoring kidney transport of organic dyes with low-molecular-weight PEGylation. *Bioconjugate chemistry*, 31(2), 241-247.

Du, Z., Munye, M. M., Tagalakis, A. D., Manunta, M. D., & Hart, S. L. (2014). The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Scientific reports*, 4(1), 7107.

Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372), eaan4672.

Durso, R. J., Andjelic, S., Gardner, J. P., Margitich, D. J., Donovan, G. P., Arrigale, R. R., ... & Olson, W. C. (2007). A novel alphavirus vaccine encoding prostate-specific membrane antigen elicits potent cellular and humoral immune responses. *Clinical cancer research*, 13(13), 3999-4008.

Durymanov, M., & Reineke, J. (2018). Non-viral delivery of nucleic acids: Insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. *Frontiers in pharmacology*, 9, 971.

Eckmann, C. R., Rammelt, C., & Wahle, E. (2011). Control of poly (A) tail length. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(3), 348-361.

Edwards DK, Jasny E, Yoon H et al (2017) Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J Transl Med* 15:1.

Eek, D., Krohe, M., Mazar, I., Horsfield, A., Pompilus, F., Friebe, R., & Shields, A. L. (2016). Patient-reported preferences for oral versus intravenous administration for the treatment of cancer: a review of the literature. *Patient preference and adherence*, 1609-1621.

Ehrengruber, M. U., Schlesinger, S., & Lundstrom, K. (2011). Alphaviruses: Semliki Forest virus and Sindbis virus vectors for gene transfer into neurons. *Current protocols in neuroscience*, 57(1), 4-22.

Ensign, L. M., Cone, R., & Hanes, J. (2012). Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advanced drug delivery reviews*, 64(6), 557-570.

Ershov, O. V., Shishlikova, M. A., Ievlev, M. Y., Belikov, M. Y., & Maksimova, V. N. (2019). DIPEA catalyzed step-by-step synthesis and photophysical properties of thieno [2, 3-b] pyridine derivatives. *Tetrahedron*, 75(34), 130465.

Ewert, K., Slack, N. L., Ahmad, A., Evans, H. M., Lin, A. J., Samuel, C. E., & Safinya, C. R. (2004). Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. *Current medicinal chemistry*, 11(2), 133-149.

Fang, Y., Xue, J., Gao, S., Lu, A., Yang, D., Jiang, H., ... & Shi, K. (2017). Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Delivery*, 24(2), 22-32.

Fernandes, J. C., Qiu, X., Winnik, F. M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., & Shi, Q. (2012). Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. *International journal of nanomedicine*, 5833-5845.

Fihurka, O., Sanchez-Ramos, J., & Sava, V. (2018). Optimizing nanoparticle design for gene therapy: protection of oligonucleotides from degradation without impeding release of cargo. *Nanomedicine & nanoscience research*, 2(6).

Fleeton, M. N., Chen, M., Berglund, P., Rhodes, G., Parker, S. E., Murphy, M., ... & Liljeström, P. (2001). Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *The Journal of infectious diseases*, 183(9), 1395-1398.

Föhse, K., Geckin, B., Zoodsma, M., Kilic, G., Liu, Z., Röring, R. J., ... & Netea, M. G. (2021). The impact of BNT162b2 mRNA vaccine on adaptive and innate immune responses. *MedRxiv*, 2021-05.

Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C et al (2011) Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother* 34:1–15.

Fretz, M. M., Høgset, A., Koning, G. A., Jiskoot, W., & Storm, G. (2007). Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. *Pharmaceutical research*, 24, 2040-2047.

Frigaard, J., Jensen, J. L., Galtung, H. K., & Hiorth, M. (2022). The potential of chitosan in nanomedicine: an overview of the cytotoxicity of chitosan based nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, 1492.

Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 5577-5591.

Funhoff, A. M., van Nostrum, C. F., Koning, G. A., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (2004). Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules*, 5(1), 32-39.

Gary, D. J., Min, J., Kim, Y., Park, K., & Won, Y. Y. (2013). The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEG ylated Poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]-B ased si RNA Complexes. *Macromolecular bioscience*, 13(8), 1059-1071.

Geall, A. J., Mandl, C. W., & Ulmer, J. B. (2013, April). RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. In *Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 2, pp. 152-159). Academic Press.

Gebre, M. S., Brito, L. A., Tostanoski, L. H., Edwards, D. K., Carfi, A., & Barouch, D. H. (2021). Novel approaches for vaccine development. *Cell*, 184(6), 1589-1603.

Giacomelli, F.C., Stepánek, P., Giacomelli, C., et al.: pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. *Soft Matter* 7, 9316–9325 (2011).

Gill, K., Minall, L., & Nassif, A. R. (2022). pDNA and mRNA vaccines. In *Practical Aspects of Vaccine Development* (pp. 157-205). Academic Press.

Gomes, G. S., Frank, L. A., Contri, R. V., Longhi, M. S., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2022). NANOTECHNOLOGY-BASED ALTERNATIVES FOR THE TOPICAL DELIVERY OF IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS IN PSORIASIS. *International Journal of Pharmaceutics*, 122535.

Granot, Y., & Peer, D. (2017, December). Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics—An innate immune system standpoint. In *Seminars in immunology* (Vol. 34, pp. 68-77). Academic Press.

Grau, M., Walker, P. R., & Derouazi, M. (2018). Mechanistic insights into the efficacy of cell penetrating peptide-based cancer vaccines. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 2887-2896.

Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 88(1-2), 1-12.

Grudzien-Nogalska, E., Stepinski, J., Jemielity, J., Zuberek, J., Stolarski, R., Rhoads, R. E., & Darzynkiewicz, E. (2007). Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCAs) and their applications in mRNA translation and stability. *Methods in enzymology*, 431, 203-227.

Grudzien-Nogalska, E., Stepinski, J., Jemielity, J., Zuberek, J., Stolarski, R., Rhoads, R. E., & Darzynkiewicz, E. (2007). Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCAs) and their applications in mRNA translation and stability. *Methods in enzymology*, 431, 203-227.

Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems. In *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics* (pp. 67-108). Elsevier.

Gurpreet K, Singh S (2018) Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian J Pharm Sci* 80:781–789.

Hajj Hussein, I., Chams, N., Chams, S., El Sayegh, S., Badran, R., Raad, M., ... & Jurjus, A. (2015). Vaccines through centuries: major cornerstones of global health. *Frontiers in public health*, 3, 269.

Hajj, K.A.; Whitehead, K.A. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mat.* 2017, 2, 1–17.

Hartmann, A. F., & Senn, M. J. (1932). studies in the metabolism of sodium R-lactate. I. Response of normal human subjects to the intravenous injection of sodium R-lactate. *The Journal of Clinical Investigation*, 11(2), 327-335.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666.

He, N., Zeng, X., Wang, W., Deng, K., Pan, Y., Xiao, L., ... & Li, K. (2011). Challenges and future expectations of reversed gene therapy. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11(10), 8634-8638.

Heidari, R., Khosravian, P., Mirzaei, S. A., & Elahian, F. (2021). siRNA delivery using intelligent chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles for overcoming multidrug resistance in malignant carcinoma cells. *Scientific reports*, 11(1), 20531.

Hoebe, K., & Beutler, B. (2004). LPS, dsRNA and the interferon bridge to adaptive immune responses: Trif, Tram, and other TIR adaptor proteins. *Journal of endotoxin research*, 10(2), 130-136.

Hoerr I, Obst R, Rammensee H-G et al (2000) In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* 30:1–7.

Hovanessian, A. G. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2'–5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 351–361 (2007).

Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J., & Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational neurodegeneration*, 4(1), 1-10.

Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N., & Irvine, D. J. (2007). Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core– shell nanoparticles. *Nano letters*, 7(10), 3056-3064.

Huang, M., Fong, C. W., Khor, E., & Lim, L. Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of controlled release*, 106(3), 391-406.

Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*, 21, 344-353.

Huang, M., Shen, A., Ding, J., & Geng, M. (2014). Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends in pharmacological sciences*, 35(1), 41-50.

Huang, X., Kong, N., Zhang, X., Cao, Y., Langer, R., & Tao, W. (2022). The landscape of mRNA nanomedicine. *Nature Medicine*, 28(11), 2273-2287.

Hudson, S. M., & Jenkins, D. W. (2002). Chitin and chitosan. *Encyclopedia of polymer science and technology*, 1.

Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*, 11(1), 11-18.

Iglesias-Lopez, C., Agustí, A., Obach, M., & Vallano, A. (2019). Regulatory framework for advanced therapy medicinal products in Europe and United States. *Frontiers in pharmacology*, 10, 921.

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343-353.

Jackson, L. A., Anderson, E. J., Roupael, N. G., Roberts, P. C., Makhene, M., Coler, R. N., ... & Beigel, J. H. (2020). An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *New England journal of medicine*, 383(20), 1920-1931.

Jacovetti, C., Bayazit, M. B., & Regazzi, R. (2021). Emerging classes of small non-coding RNAs with potential implications in diabetes and associated metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 670719.

Janeway, C. A., Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Immunobiologie*. De Boeck Supérieur.

Jerjes, W., Theodossiou, T. A., Hirschberg, H., Høgset, A., Weyergang, A., Selbo, P. K., ... & Berg, K. (2020). Photochemical internalization for intracellular drug delivery. From basic mechanisms to clinical research. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 528.

Jiang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Xu, E., Ho, A., Singh, P., ... & Saltzman, W. M. (2020). Quantitating endosomal escape of a library of polymers for mRNA delivery. *Nano letters*, 20(2), 1117-1123.

Joe, P. T., Christopoulou, I., Van Hoecke, L., Schepens, B., Ysenbaert, T., Heirman, C., ... & Aerts, J. L. (2019). Intranodal administration of mRNA encoding nucleoprotein provides cross-strain immunity against influenza in mice. *Journal of Translational Medicine*, 17, 1-14.

Jones, K. L., Drane, D. & Gowans, E. J. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 43, 675–81 (2007).

Kamat, V., Bodas, D., & Paknikar, K. (2016). Chitosan nanoparticles synthesis caught in action using microdroplet reactions. *Scientific reports*, 6(1), 22260.

Kang, S. M., & Compans, R. W. (2009). Host responses from innate to adaptive immunity after vaccination: molecular and cellular events. *Molecules and cells*, 27, 5-14.

Kanipandian, N., Kannan, S., Ramesh, R., Subramanian, P., & Thirumurugan, R. (2014). Characterization, antioxidant and cytotoxicity evaluation of green synthesized silver nanoparticles using *Cleistanthus collinus* extract as surface modifier. *Materials Research Bulletin*, 49, 494-502.

Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic acids research*, 39(21), e142-e142.

Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 12542–50 (2004).

Kashem, S. W., Haniffa, M., & Kaplan, D. H. (2017). Antigen-presenting cells in the skin. *Annual review of immunology*, 35, 469-499.

Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1-5.

Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 3-11.

Kieny, M. P., Costa, A., Hombach, J., Carrasco, P., Pervikov, Y., Salisbury, D., ... & Fukuda, K. (2006). A global pandemic influenza vaccine action plan. *Vaccine*, 24(40-41), 6367-6370.

Kim, S. C., Sekhon, S. S., Shin, W. R., Ahn, G., Cho, B. K., Ahn, J. Y., & Kim, Y. H. (2021). Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Molecular & Cellular Toxicology*, 1-8.

Kis, Z. (2022). Stability modelling of mRNA vaccine quality based on temperature monitoring throughout the distribution chain. *Pharmaceutics*, 14(2), 430.

Knezevic, I., Liu, M. A., Peden, K., Zhou, T., & Kang, H. N. (2021). Development of mRNA vaccines: scientific and regulatory issues. *Vaccines*, 9(2), 81.

Kobelt, D., Aumann, J., Schmidt, M., Wittig, B., Fichtner, I., Behrens, D., ... & Walther, W. (2014). Preclinical study on combined chemo-and nonviral gene therapy for sensitization of melanoma using a human TNF-alpha expressing MIDGE DNA vector. *Molecular oncology*, 8(3), 609-619.

Koch, G. (1973). Interaction of poliovirus-specific RNAs with HeLa cells and E. coli. *Current Topics in Microbiology and Immunology/Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung: Volume 62*, 89-138.

Kohrs, N. J., Liyanage, T., Venkatesan, N., Najarzadeh, A., & Puleo, D. A. (2019). Drug delivery systems and controlled release.

Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M., & Lee, S. B. (2011). Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*, 6(5), 929-941.

Kono, Y., Iwasaki, A., Matsuoka, K., & Fujita, T. (2016). Effect of mechanical agitation on cationic liposome transport across an unstirred water layer in caco-2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(8), 1293-1299.

Kormann, M. S., Hasenpusch, G., Aneja, M. K., Nica, G., Flemmer, A. W., Herber-Jonat, S., ... & Rudolph, C. (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature biotechnology*, 29(2), 154-157.

Körner, C. G., & Wahle, E. (1997). Poly (A) tail shortening by a mammalian poly (A)-specific 3'-exoribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10448-10456.

Korosec, C. S., Farhang-Sardroodi, S., Dick, D. W., Gholami, S., Ghaemi, M. S., Moyles, I. R., ... & Heffernan, J. M. (2022). Long-term durability of immune responses to the BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines based on dosage, age and sex. *Scientific reports*, 12(1), 21232.

Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L., & Anderson, D. G. (2019). Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Molecular Therapy*, 27(4), 710-728.

Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283–92 (1986).

Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., ... & Sahin, U. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*, 534(7607), 396-401.

Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. In *Medicinal spices and vegetables from Africa* (pp. 271-297). Academic Press.

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb-prot095497.

Kunjachan, S., Jose, S., & Lammers, T. (2010). Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 4(2).

Kwon, S., Kwon, M., Im, S., Lee, K., & Lee, H. (2022). mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA. *Archives of pharmacal research*, 45(4), 245-262.

L. C. Gomes-da-Silva, N. A. Fonseca, V. Moura, M. C. Pedroso de Lima, S. Simões, and J. N. Moreira, Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: Paradigms and challenges. *Acc. Chem. Res.* 45, 1163 (2012).

Lacroix, C., Humanes, A., Coiffier, C., Gigmes, D., Verrier, B., & Trimaille, T. (2020). Polylactide-based reactive micelles as a robust platform for mRNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 37, 1-12.

Lallana, E., Rios de la Rosa, J. M., Tirella, A., Pelliccia, M., Gennari, A., Stratford, I. J., ... & Tirelli, N. (2017). Chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: rational design revisited for RNA delivery. *Molecular pharmaceutics*, 14(7), 2422-2436.

Lang, P. O., Govind, S., & Aspinall, R. (2012). L'immunosénescence. *NPG Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie*, 12(70), 171-181.

Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.

Layek, B., Lipp, L., & Singh, J. (2015). APC targeted micelle for enhanced intradermal delivery of hepatitis B DNA vaccine. *Journal of Controlled Release*, 207, 143-153.

Lee, J., & Ye, Y. (2018). The roles of endo-lysosomes in unconventional protein secretion. *Cells*, 7(11), 198.

Lee, K., Kim, M., Seo, Y., & Lee, H. (2018). Development of mRNA vaccines and their prophylactic and therapeutic applications. *Nano Research*, 11, 5173-5192.

Lee, M., Nah, J. W., Kwon, Y., Koh, J. J., Ko, K. S., & Kim, S. W. (2001). Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 18, 427-431.

Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, 4(1), 26-49.

Li, M., Wang, Z., Xie, C., & Xia, X. (2022). Advances in mRNA vaccines. *International Review of Cell and Molecular Biology*.

Li, W., Ma, L., Guo, L. P., Wang, X. L., Zhang, J. W., Bu, Z. G., & Hua, R. H. (2017). West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. *Scientific Reports*, 7(1), 3286.

Lindsay, K. E., Vanover, D., Thoresen, M., King, H., Xiao, P., Badial, P., ... & Santangelo, P. J. (2020). Aerosol delivery of synthetic mRNA to vaginal mucosa leads to durable expression of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Molecular Therapy*, 28(3), 805-819.

Liu, M. A. (2019). A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines*, 7(2), 37.

Liu, Q. Comparative analysis of base biases around the stop codons in six eukaryotes. *Biosystems* 81, 281–289 (2005).

Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. Ø., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., ... & Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288.

Livingstone, M., Atas, E., Meller, A., & Sonenberg, N. (2010). Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Physical biology*, 7(2), 021001.

Loh, J. W., Saunders, M., & Lim, L. Y. (2012). Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 262(3), 273-282.

Lorenzi, J. C., Trombone, A. P., Rocha, C. D., Almeida, L. P., Lousada, R. L., Malardo, T., ... & Coelho-Castelo, A. A. (2010). Intranasal vaccination with messenger RNA as a new approach in gene therapy: use against tuberculosis. *BMC biotechnology*, 10(1), 1-11.

Lou, P. J., Lai, P. S., Shieh, M. J., MacRobert, A. J., Berg, K., & Bown, S. G. (2006). Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *International journal of cancer*, 119(11), 2692-2698.

Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., & Abdellah, A. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.

Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. In *Handbook of non-invasive drug delivery systems* (pp. 59-94). William Andrew Publishing.

Lu, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2007). Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes. *Biomaterials*, 28(21), 3255-3262.

Lundstrom, K. (2009). Alphaviruses in gene therapy. *Viruses*, 1(1), 13-25.

Lundstrom, K. (2018). Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future science OA*, 4(5), FSO300.

Lundstrom, K. (2018). Self-replicating RNA viruses for RNA therapeutics. *Molecules*, 23(12), 3310.

Lundstrom, K. (2018). Viral vectors in gene therapy. *Diseases*, 6(2), 42.

Lundstrom, K. (2019). RNA viruses as tools in gene therapy and vaccine development. *Genes*, 10(3), 189.

Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Göpferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 247-266.

Lyons, D. M., & Lauring, A. S. (2018). Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses*, 10(8), 407.

Ma, Z., & Lim, L. Y. (2003). Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 20, 1812-1819.

Maiyo, F., & Singh, M. (2019). Folate-targeted mRNA delivery using chitosan-functionalized selenium nanoparticles: potential in cancer immunotherapy. *Pharmaceutics*, 12(4), 164.

Mak, T. W., Saunders, M. E., & Jett, B. D. (2013). *Primer to the immune response*. Newnes.

Malatesta, M., Grecchi, S., Chiesa, E., Cisterna, B., Costanzo, M., & Zancanaro, C. (2015). Internalized chitosan nanoparticles persist for long time in cultured cells. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 59(1).

Malhotra, Meenakshi, et al. "A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis." *International journal of nanomedicine* (2011): 485-494.

Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2008). Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology*, 38(5), 1404-1413.

Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12-27.

Martinez Junior, A. M., de Souza, R. H. F. V., Petrônio, M. S., Martins, G. O., Fernandes, J. C., Benderdour, M., ... & Tiera, M. J. (2022). Double-grafted chitosans as siRNA nanocarriers: effects of diisopropylethylamine substitution and labile-PEG coating. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 1-20.

Martinez Junior, A. M., Lima, A. M. F., Martins, G. O., Tiera, V. A. D. O., Benderdour, M., Fernandes, J. C., & Tiera, M. J. (2022). Impact of Degree of Ionization and PEGylation on the Stability of Nanoparticles of Chitosan Derivatives at Physiological Conditions. *Marine Drugs*, 20(8), 476.

Martínez-Jothar, L., Beztsinna, N., van Nostrum, C. F., Hennink, W. E., & Oliveira, S. (2019). Selective cytotoxicity to HER2 positive breast cancer cells by saporin-loaded nanobody-targeted polymeric nanoparticles in combination with photochemical internalization. *Molecular pharmaceutics*, 16(4), 1633-1647.

Maruggi, G., Ulmer, J. B., Rappuoli, R., & Yu, D. (2021). Self-amplifying mRNA-based vaccine technology and its mode of action. In *mRNA Vaccines* (pp. 31-70). Cham: Springer International Publishing.

Mascola, J. R. (2015). The modern era of HIV-1 vaccine development. *Science*, 349(6244), 139-140.

Massignani, M., Canton, I., Sun, T., Hearnden, V., MacNeil, S., Blanz, A., ... & Battaglia, G. (2010). Enhanced fluorescence imaging of live cells by effective cytosolic delivery of probes. *PLoS one*, 5(5), e10459.

Matica, A., Menghiu, G., & Ostafe, V. (2017). TOXICITY OF CHITOSAN BASED PRODUCTS. *New Frontiers in Chemistry*, 26(1).

McCarthy, H. O., McCaffrey, J., McCrudden, C. M., Zholobenko, A., Ali, A. A., McBride, J. W., ... & Robson, T. (2014). Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-inspired amphipathic peptide for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 189, 141-149.

McCullough KC, Bassi I, Milona P et al (2014) Self-replicating replicon-RNA delivery to dendritic cells by chitosan-nanoparticles for translation in vitro and in vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* 3:e173.

McQueen, C. (2017). *Comprehensive toxicology*. Elsevier.

Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J. A., Abudu, Y. P., Larsen, K. B., ... & Johansen, T. (2018). Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *Journal of cell biology*, 217(10), 3640-3655.

Mendes, B. B., Conriot, J., Avital, A., Yao, D., Jiang, X., Zhou, X., ... & Conde, J. (2022). Nanodelivery of nucleic acids. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 24.

Michael, P. L., Lam, Y. T., Hung, J., Tan, R. P., Santos, M., & Wise, S. G. (2021). Comprehensive Evaluation of the Toxicity and Biosafety of Plasma Polymerized Nanoparticles. *Nanomaterials*, 11(5), 1176.

Michanek, A.; Kristen, N.; Hook, F.; Nylander, T.; Sparr, E. RNA and DNA interactions with zwitterionic and charged lipid membranes - a DSC and QCM-D study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2010, 1798, 829–838.

Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in biochemistry*, 63(4), 433-456.

Minor, P. D. (2015). Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 479, 379-392.

Mobarakeh, V. I., Modarressi, M. H., Rahimi, P., Bolhassani, A., Arefian, E., Atyabi, F., & Vahabpour, R. (2019). Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. *International journal of biological macromolecules*, 129, 305-315.

Monteiro-Riviere, N. A., Oldenburg, S. J., & Inman, A. O. (2010). Interactions of aluminum nanoparticles with human epidermal keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 30(3), 276-285.

Montenegro, L., Trapani, A., Fini, P., Mandracchia, D., Latrofa, A., Cioffi, N., ... & Puglisi, G. (2014). Chitosan nanoparticles for topical co-administration of the antioxidants glutathione and idebenone: Characterization and in vitro release. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(20), 2387.

Nallagatla, S. R., & Bevilacqua, P. C. (2008). Nucleoside modifications modulate activation of the protein kinase PKR in an RNA structure-specific manner. *Rna*, 14(6), 1201-1213.

Nan, W., Ding, L., Chen, H., Khan, F. U., Yu, L., Sui, X., & Shi, X. (2018). Topical use of quercetin-loaded chitosan nanoparticles against ultraviolet B radiation. *Frontiers in pharmacology*, 9, 826.

Nelson, Christopher E., et al. "Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo." *ACS nano* 7.10 (2013): 8870-8880.

Newport, M. J., Goetghebuer, T., Weiss, H. A., Whittle, H., Siegrist, C. A., & Marchant, A. (2004). Genetic regulation of immune responses to vaccines in early life. *Genes & Immunity*, 5(2), 122-129.

Nitika, Wei, J., & Hui, A. M. (2022). The delivery of mRNA vaccines for therapeutics. *Life*, 12(8), 1254.

Nwagwu, C. S., Ugwu, C. N., Ogbonna, J. D. N., Onugwu, A. L., Agbo, C. P., Echezona, A. C., ... & Attama, A. A. (2022). Recent and advanced nano-technological strategies for

COVID-19 vaccine development. In *Methods in Microbiology* (Vol. 50, pp. 151-188). Academic Press.

Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International journal of nanomedicine*, 9(sup1), 51-63.

Oliveira, F. D. P. P., Dalla Picola, I. P., Shi, Q., Barbosa, H. F. G., de Oliveira Tiera, V. A., Fernandes, J. C., & Tiera, M. J. (2013). Synthesis and evaluation of diethylethylamine–chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. *Nanotechnology*, 24(5), 055101.

Orphanides, G., & Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell*, 108(4), 439-451.

P. Ojer, L. Neutsch, F. Gabor, J. M. Irache, and A. L. de Cerain, Cytotoxicity and cell interaction studies of bioadhesive poly(anhydride) nanoparticles for oral antigen/drug delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 9, 1891 (2013).

Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H et al (2015) Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release* 217:345–351.

Pardi, N., Hogan, M. J., Pelc, R. S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C. R., ... & Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 543(7644), 248-251.

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature reviews Drug discovery*, 17(4), 261-279.

Pardi, N., Secreto, A. J., Shan, X., Debonera, F., Glover, J., Yi, Y., ... & Weissman, D. (2017). Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nature communications*, 8(1), 14630.

- Park, J. E., Yi, H., Kim, Y., Chang, H., & Kim, V. N. (2016). Regulation of poly (A) tail and translation during the somatic cell cycle. *Molecular cell*, 62(3), 462-471.
- Pasare, C., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and infection*, 6(15), 1382-1387.
- Pascolo, S. (2005). RNA-Based Therapies. *Drug Discovery Handbook*, 1259-1308.
- Pashine, A., Valiante, N. M., & Ulmer, J. B. (2005). Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature medicine*, 11(Suppl 4), S63-S68.
- Patel, S., Athirasala, A., Menezes, P. P., Ashwanikumar, N., Zou, T., Sahay, G., & Bertassoni, L. E. (2019). Messenger RNA delivery for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Tissue Engineering Part A*, 25(1-2), 91-112.
- Patil ML, Zhang M, Taratula O, Garbuzenko OB, He H, Minko T. Internally cationic polyamidoamine PAMAM-OH dendrimers for siRNA delivery: effect of the degree of quaternization and cancer targeting. *Biomacromolecules* 2009, 10: 258–266.
- Peniche, H., & Peniche, C. (2011). Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. *Polymer International*, 60(6), 883-889.
- Petsch, B. et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat. Biotechnol.* 30, 1210–6 (2012).
- Phua, K. K., Leong, K. W., & Nair, S. K. (2013). Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *Journal of Controlled Release*, 166(3), 227-233.
- Pichlmair, A. et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997–1001 (2006).

Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., ... & Tenukova, T. (2019). pH-sensitive chitosan–heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells. *Pharmaceutics*, 11(7), 317.

Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(2), C272-C279.

Plapied, L., Vandermeulen, G., Vroman, B., Pr at, V., & des Rieux, A. (2010). Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *International journal of pharmaceutics*, 398(1-2), 210-218.

Plianwong, S., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., & Rojanarata, T. (2013). Chitosan combined with poly-L-arginine as efficient, safe, and serum-insensitive vehicle with RNase protection ability for siRNA delivery. *BioMed Research International*, 2013.

Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., ... & Gruber, W. C. (2020). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England journal of medicine*, 383(27), 2603-2615.

Pollard, C., Rejman, J., De Haes, W., Verrier, B., Van Gulck, E., Naessens, T., ... & De Koker, S. (2013). Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Molecular Therapy*, 21(1), 251-259.

Poshina, D. N., Raik, S. V., Poshin, A. N., & Skorik, Y. A. (2018). Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. *Polymer degradation and stability*, 156, 269-278.

Prasmickaite, L., Høgset, A., & Berg, K. (2001). Evaluation of Different Photosensitizers for Use in Photochemical Gene Transfection. *Photochemistry and photobiology*, 73(4), 388-395.

Prather, K. J., Sagar, S., Murphy, J., & Chartrain, M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and microbial technology*, 33(7), 865-883.

- Pujals, S., Fernández-Carneado, J., López-Iglesias, C., Kogan, M. J., & Giralt, E. (2006). Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 1758(3), 264-279.
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, 124(4), 849-863.
- Qin, F., Xia, F., Chen, H., Cui, B., Feng, Y., Zhang, P., ... & Luo, M. (2021). A guide to nucleic acid vaccines in the prevention and treatment of infectious diseases and cancers: from basic principles to current applications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 633776.
- Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., ... & Song, X. (2022). mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 166.
- Qiu, Y., Man, R. C., Liao, Q., Kung, K. L., Chow, M. Y., & Lam, J. K. (2019). Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide. *Journal of Controlled Release*, 314, 102-115.
- Ramamoorthi, M., & Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy-an overview. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(1), GE01.
- Ramirez, J. E. V., Sharpe, L. A., & Peppas, N. A. (2017). Current state and challenges in developing oral vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 114, 116-131.
- Rashid, M. U., & Coombs, K. M. (2019). Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 7718-7724.
- Rayamajhi, S., Marchitto, J., Nguyen, T. D. T., Marasini, R., Celia, C., & Aryal, S. (2020). pH-responsive cationic liposome for endosomal escape mediated drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110804.

Reddy, S. T., Van Der Vlies, A. J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G. J., O'Neil, C. P., ... & Hubbell, J. A. (2007). Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nature biotechnology*, 25(10), 1159-1164.

Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jaklenec, A., Langer, R., & Blankschtein, D. (2016). mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic delivery*, 7(5), 319-334.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical journal*, 377(1), 159-169.

Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L., & Leitner, W. W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene therapy*, 7(2), 89-92.

Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan–DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules*, 14(6), 1732-1740.

Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., ... & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 168(6), 1114-1125.

Ringer S (1882) Regarding the action of hydrate of soda, hydrate of ammonia, and hydrate of potash on the ventricle of the frog's heart. *J Physiol* 3(195–202):6.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature medicine*, 10(9), 909-915.

Rozovics, J. M., Chase, A. J., Cathcart, A. L., Chou, W., Gershon, P. D., Palusa, S., ... & Semler, B. L. (2012). Picornavirus modification of a host mRNA decay protein. *MBio*, 3(6), 10-1128.

Rubanyi, G. M. (2001). The future of human gene therapy. *Molecular aspects of medicine*, 22(3), 113-142.

- Sachdeva, M., & Arora, S. K. (2022). Strategies of Vaccine Development. In *Biomedical Translational Research: Technologies for Improving Healthcare* (pp. 407-426). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Safinya, C. R. (2001). Structures of lipid–DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(4), 440-448.
- Sahin, U., Karikó, K., & Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 13(10), 759-780.
- Sahin, U., Oehm, P., Derhovanessian, E., Jabulowsky, R. A., Vormehr, M., Gold, M., ... & Türeci, Ö. (2020). An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature*, 585(7823), 107-112.
- Sandbrink, J. B., & Shattock, R. J. (2020). RNA vaccines: a suitable platform for tackling emerging pandemics?. *Frontiers in Immunology*, 11, 608460.
- Sayour, E. J., & Mitchell, D. A. (2017). Manipulation of innate and adaptive immunity through cancer vaccines. *Journal of immunology research*, 2017.
- Scheel, B., Teufel, R., Probst, J., Carralot, J. P., Geginat, J., Radsak, M., ... & Pascolo, S. (2005). Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *European journal of immunology*, 35(5), 1557-1566.
- Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. (2021). mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International journal of pharmaceutics*, 601, 120586.
- Selby, L. I., Cortez-Jugo, C. M., Such, G. K., & Johnston, A. P. (2017). Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(5), e1452.
- Self, W. H., Tenforde, M. W., Rhoads, J. P., Gaglani, M., Ginde, A. A., Douin, D. J., ... & Cass, C. (2021). Comparative effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) vaccines in preventing COVID-19 hospitalizations among adults

without immunocompromising conditions—United States, March–August 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(38), 1337.

Selmi, A., Vascotto, F., Kautz-Neu, K., Türeci, Ö., Sahin, U., von Stebut, E., ... & Kreiter, S. (2016). Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65, 1075-1083.

Semple, S. C., Leone, R., Barbosa, C. J., Tam, Y. K., & Lin, P. J. (2022). Lipid nanoparticle delivery systems to enable mRNA-based therapeutics. *Pharmaceutics*, 14(2), 398.

Seubert, A., Calabro, S., Santini, L., Galli, B., Genovese, A., Valentini, S., ... & De Gregorio, E. (2011). Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(27), 11169-11174.

Shi, Q., Rondon-Cavanzo, E. P., Dalla Picola, I. P., Tiera, M. J., Zhang, X., Dai, K., ... & Fernandes, J. C. (2018). In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *International journal of nanomedicine*, 13, 387.

Shilakari Asthana, G., Asthana, A., Kohli, D. V., & Vyas, S. P. (2014). Mannosylated chitosan nanoparticles for delivery of antisense oligonucleotides for macrophage targeting. *BioMed Research International*, 2014.

Singh, A. (2021). Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. *Nature nanotechnology*, 16(1), 16-24.

Singha, K., Namgung, R., & Kim, W. J. (2011). Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic acid therapeutics*, 21(3), 133-147.

Sköld AE, van Beek JJP, Sittig SP et al (2015) Protamine-stabilized RNA as an ex vivo stimulant of primary human dendritic cell subsets. *Cancer Immunol Immunother: CII* 64:1461–1473.

Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P., & Such, G. K. (2018). The endosomal escape of nanoparticles: toward more efficient cellular delivery. *Bioconjugate chemistry*, 30(2), 263-272.

Song, W., Ye, Q., Li, Z., Hou, Y., Niu, L., Ma, Z., & Yang, C. (2022). Disregarded determinant role of transfection medium in chitosan mediated siRNA delivery. *Materials & Design*, 219, 110748.

St. Croix, C. M., Shand, S. H., & Watkins, S. C. (2005). Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *Biotechniques*, 39(6), S2-S5.

Stauffer, F., El-Bacha, T., & Da Poian, A. T. (2006). Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 1(3), 291- 296.

Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 68(3), 160-166.

Stern, A. M., & Markel, H. (2005). The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges. *Health affairs*, 24(3), 611-621.

Stewart, M. P., Langer, R., & Jensen, K. F. (2018). Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts. *Chemical reviews*, 118(16), 7409- 7531.

Stitz, L., Vogel, A., Schnee, M., Voss, D., Rauch, S., Mutzke, T., ... & Petsch, B. (2017). A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(12), e0006108.

Strand, S. P., Lelu, S., Reitan, N. K., de Lange Davies, C., Artursson, P., & Vårum, K. M. (2010). Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31(5), 975-987.

Suk, Jung Soo, et al. "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery." *Advanced drug delivery reviews* 99 (2016): 28-51.

Sung, J., Alghoul, Z., Long, D., Yang, C., & Merlin, D. (2022). Oral delivery of IL-22 mRNA-loaded lipid nanoparticles targeting the injured intestinal mucosa: A novel therapeutic solution to treat ulcerative colitis. *Biomaterials*, 288, 121707.

Swartz, M. A., Berk, D. A., & Jain, R. K. (1996). Transport in lymphatic capillaries. I. Macroscopic measurements using residence time distribution theory. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 270(1), H324-H329.

Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., & Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *Journal of controlled release*, 150(3), 238-247.

Thandapani, G., Prasad, S., Sudha, P. N., & Sukumaran, A. (2017). Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1794-1806.

Tiyaboonchai, W. (2013). Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)*, 11(3), 51-66.

Tombácz, I., Weissman, D., & Pardi, N. (2021). Vaccination with messenger RNA: a promising alternative to DNA vaccination. *DNA Vaccines: Methods and Protocols*, 13-31.

Tsoras, A. N., & Champion, J. A. (2019). Protein and peptide biomaterials for engineered subunit vaccines and immunotherapeutic applications. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 10, 337-359.

Ulmer, J. B., Mason, P. W., Geall, A., & Mandl, C. W. (2012). RNA-based vaccines. *Vaccine*, 30(30), 4414-4418.

Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current pharmaceutical design*, 16(1), 3-10.

Valente, J. F. A., Pereira, P., Sousa, A., Queiroz, J. A., & Sousa, F. (2021). Effect of plasmid DNA size on chitosan or polyethyleneimine polyplexes formulation. *Polymers*, 13(5), 793.

van den Brand, D., Gorris, M. A., van Asbeck, A. H., Palmen, E., Ebisch, I., Dolstra, H., ... & Brock, R. (2019). Peptide-mediated delivery of therapeutic mRNA in ovarian cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 141, 180-190.

Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 220-228.

Venkatesan, S., Gershowitz, A., & Moss, B. (1980). Modification of the 5' end of mRNA. Association of RNA triphosphatase with the RNA guanylyltransferase-RNA (guanine-7-) methyltransferase complex from vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 255(3), 903-908.

Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., & Dewitte, H. (2019). Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today*, 28, 100766.

Vermeulen, L. M., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K. (2018). The proton sponge hypothesis: Fable or fact?. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 129, 184-190.

Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today*, 10(21), 1451-1458.

Vesikari, T., Forstén, A., Herbinger, K. H., Della Cioppa, G., Beygo, J., Borkowski, A., ... & von Sonnenburg, F. (2012). Safety and immunogenicity of an MF59[®]-adjuvanted A/H5N1 pre-pandemic influenza vaccine in adults and the elderly. *Vaccine*, 30(7), 1388-1396.

Vivinus, S., Baulande, S., van Zanten, M., Campbell, F., Topley, P., Ellis, J. H., ... & Coste, H. (2001). An element within the 5' untranslated region of human Hsp70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *European Journal of Biochemistry*, 268(7), 1908-1917.

Vogel, A. B., Lambert, L., Kinnear, E., Busse, D., Erbar, S., Reuter, K. C., ... & Tregoning, J. S. (2018). Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Molecular Therapy*, 26(2), 446-455.

Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Simard, P., Leroux, J. C., & Benoit, J. P. (2006). Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 78(3), 620- 628.

Wadhwa, A., Aljabbari, A., Lokras, A., Foged, C., & Thakur, A. (2020). Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*, 12(2), 102.

Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.

Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 765-774.

Wang, X. (2021). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 384(16), 1577-1578.

Wang, Y., Zhang, Z., Luo, J., Han, X., Wei, Y., & Wei, X. (2021). mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer*, 20(1), 33.

Wartosch, L., Bright, N. A., & Luzio, J. P. (2015). Lysosomes. *Current Biology*, 25(8), R315-R316.

Wasungu, L., & Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *Journal of Controlled Release*, 116(2), 255-264.

Wei, J., & Hui, A. M. (2022). The Delivery of mRNA Vaccines for Therapeutics. *Life*, 12(8), 1254.

Weinberger, B., Herndler-Brandstetter, D., Schwanninger, A., Weiskopf, D., & Grubeck-Loebenstein, B. (2008). Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 1078-1084.

Whisenand, J.M.; Azizian, K.T.; Henderson, J.M.; Shore, S.; Shin, D.; Lebedev, A.; McCaffrey, A.P.; Hogrefe, R.I. Considerations for the Design and cGMP Manufacturing of mRNA Therapeutics. Available online: https://www.trilinkbiotech.com/work/mRNA_OTs1.pdf (accessed on 21 February 2019).

Win, K. Y., & Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949), 1465-1468.

Woolf, Thomas B., and Benoît Roux. "Structure, energetics, and dynamics of lipid– protein interactions: a molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 24.1 (1996): 92-114.

Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., & Krug, H. F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters*, 6(6), 1261-1268.

Xu, H., Li, Z., & Si, J. (2014). Nanocarriers in gene therapy: a review. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(12), 3483-3507.

Yadav, D. K., Yadav, N., & Khurana, S. M. P. (2020). Vaccines: present status and applications. In *Animal biotechnology* (pp. 523-542). Academic Press.

Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J., & Rudolph, C. (2009). Current prospects for mRNA gene delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 484-489.

Yang, C., Gao, S., & Kijms, J. (2014). Folic acid conjugated chitosan for targeted delivery of siRNA to activated macrophages in vitro and in vivo. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8608-8615.

Yang, Z., Liu, T., Xie, Y., Sun, Z., Liu, H., Lin, J., ... & Nie, S. (2015). Chitosan layered gold nanorods as synergistic therapeutics for photothermal ablation and gene silencing in triple-negative breast cancer. *Acta biomaterialia*, 25, 194-204.

Yasar, H., Biehl, A., De Rossi, C., Koch, M., Murgia, X., Loretz, B., & Lehr, C. M. (2018). Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 1-19.

Yeh, T. H., Hsu, L. W., Tseng, M. T., Lee, P. L., Sonjae, K., Ho, Y. C., & Sung, H. W. (2011). Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials*, 32(26), 6164-6173.

Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(8), 541-555.

Youn, H., & Chung, J. K. (2015). Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert opinion on biological therapy*, 15(9), 1337-1348.

Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174.

Yu, H., Guo, C., Feng, B., Liu, J., Chen, X., Wang, D., ... & Li, Y. (2016). Triple-layered pH-responsive micelleplexes loaded with siRNA and cisplatin prodrug for NF-Kappa B targeted treatment of metastatic breast cancer. *Theranostics*, 6(1), 14.

Zeng, C., Hou, X., Yan, J., Zhang, C., Li, W., Zhao, W., ... & Dong, Y. (2020). Leveraging mRNA sequences and nanoparticles to deliver SARS-CoV-2 antigens in vivo. *Advanced Materials*, 32(40), 2004452.

Zeng, C., Zhang, C., Walker, P. G., & Dong, Y. (2020). Formulation and delivery technologies for mRNA vaccines. In *mRNA Vaccines* (pp. 71-110). Cham: Springer International Publishing.

Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H., & Li, J. (2019). Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 594.

Zhao, J., & Stenzel, M. H. (2018). Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry*, 9(3), 259-272.

Zhao, Q. Q., Chen, J. L., Lv, T. F., He, C. X., Tang, G. P., Liang, W. Q., ... & Gao, J. Q. (2009). N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(4), 706-710.

Zhou, G., Xu, Y., Chen, M., et al.: Tumor-penetrating peptide modified and pH-sensitive polyplexes for tumor targeted siRNA delivery. *Polym. Chem.* 7, 3857–3863 (2016).

Zohra, F. T., Chowdhury, E. H., Tada, S., Hoshiba, T., & Akaike, T. (2007). Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(1), 373-378.