

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR 4301)

THÈSE présentée par : Albert NGALLE LOTH

soutenue le : 03 juin 2025

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie - biologie moléculaire et cellulaire, thérapie
génique

Développement et caractérisation de système de délivrance lipidique d'ARNm thérapeutique pour la médecine régénérative

THÈSE dirigée par :

LOGEART AVRAMOGLU Delphine DR CNRS, co-directrice de thèse (B30A, Paris)
PERCHE Federico CR CNRS, co-directeur de thèse (CBM, Orléans)

RAPPORTEURS :

LADAVIERE Catherine DR CNRS (Ingénierie des matériaux polymères, Villeurbanne)
HILLAIREAU Hervé PU, (Institut Galien, Saclay)

JURY :

ROUTIER Sylvain	PU, président du jury (ICOA, Orléans)
LOGEART AVRAMOGLU Delphine	DR CNRS, co-directrice de thèse (B30A, Paris)
PERCHE Federico	CR CNRS, co-directeur de thèse (CBM, Orléans)
LADAVIERE Catherine	DR CNRS (IMP, Villeurbanne)
HILLAIREAU Hervé	PU, (Institut Galien, Saclay)
MIGNET Nathalie	DR CNRS, Examinatrice (UTCBS, Paris)

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse Delphine LOGEART AVRAMOGLU et Federico PERCHE que je remercie pour m'avoir guidé, inspiré et encouragé durant ces trois années de thèse, ainsi que pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Je remercie les chefs des deux équipes au sein desquelles j'ai évolué durant ma thèse, Chantal PICHON et Josef HAMACEK pour m'avoir accueilli, pour leurs conseils avisés et leur disponibilité. J'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse Catherine LADAVIERE, Hervé HILLIAIREAUX, Nathalie MIGNET et Sylvain ROUTIER pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je tiens à remercier mes collègues du B3OA à Paris, particulièrement Manon MAROQUENNE pour son aide précieuse, ainsi que mes collègues nantais, Valérie GEOFFROY, Pierre WEISS, Pierre GUIHARD et Sarah BERTIN pour nos collaborations et nos échanges constructifs. Aussi, je souhaite remercier l'agence nationale de la recherche (ANR) pour leur financement, essentiel à la réalisation de la majorité de ces travaux.

Un grand merci à Léna GUYON, Delphine MAZE, Christophe DELEHEDDE et David GOSSET pour leurs précieux conseils, qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours, et continueront sans aucun doute à m'être utiles à l'avenir. Je souhaite aussi exprimer ma reconnaissance auprès de l'ensemble du personnel du CBM à Orléans, notamment Christine GABANT, Laëticia LEGOUPIL et Matthieu REFREGIERS pour leur écoute attentive et leur assistance.

Je remercie aussi mes collègues de l'équipe « Thérapies innovantes » et « Assemblages moléculaires et systèmes complexes » pour leur générosité et leur bienveillance. Aussi, je remercie chaleureusement Dounia HEZILI, Éric KAYA, El Hadji CISSE, Hugo GENON et Sara BEN JEMAA, pour la motivation qu'ils m'ont apporté

durant la totalité de ma thèse, et pour tous ces moments passés ensemble qui m'emplissent déjà de nostalgie.

Je souhaite aussi remercier Josipa CECIC VIDOS, Clara DELIMESLE, Ivan CIGANEK, Pamela GUERILLOT, Océane QUIN et Nabila LAROUI pour chaque moments, aussi éphémères soient-ils, partagés au fil des années.

En somme, je remercie ces précieux collègues, qui au-delà du cadre professionnel, sont pour certains devenus de véritables amis. Par conséquent, je remercie chaleureusement Ayoub MEDJMEDJ, pour sa générosité, son soutien sans relâche, et pour la magnifique amitié que nous avons tissée durant ces 3 années « ah, heureusement que t'es là m'sieur Ayoub hein ! », cette thèse n'aurait clairement pas eu la même saveur sans toi, merci pour tout.

Je tiens aussi à remercier les stagiaires de passage dans l'équipe, notamment Rana OKHRAVI et Arthur ORTSCHKEIT avec qui j'ai particulièrement aimé collaborer. Vous avez apporté beaucoup, sans même vous en rendre compte.

J'aimerais remercier Loëtitia BENOIST et Christophe HANO deux personnes qui m'ont donnée envie de m'orienter vers le domaine des sciences naturelles, ma professeure de physique chimie de terminale d'une part, et mon professeur de biologie moléculaire en licence d'autre part. J'espère que vous continuez à faire ce travail magnifique et que vous continuerez à transmettre le gout de la science aux générations futures, merci à vous.

Je remercie ma famille pour leur soutien continu inestimable, ma compagne qui a vécu cette thèse presque aussi intensément que moi, ainsi que mon adorable petit garçon, qui a rapidement fait ses nuits pour que papa puisse tenter de garder le rythme. Je remercie mon frère et sa petite famille, ainsi que mes chères parents qui se sont efforcés de me soutenir, me motiver, m'encourager à chaque instants.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribuées à la mise en œuvre de ces travaux, notamment celles que j'ai possiblement oubliées.

Merci à tous !

Sommaire

Remerciements	4
Liste des abréviations	9
Table des figures	12
Table des tableaux	16
INTRODUCTION GENERALE.....	19
CHAPITRE 1 : Les thérapie à base d'ARNm.....	22
1.1. Introduction à l'ARN	22
1.1.1. Nucléosides et nucléotides.....	22
1.1.2. Différences entre ARN et ADN	23
1.1.3. Les structures de l'ARN	23
1.2. Les ARN cellulaires et l'ARN messenger endogène	24
1.2.1. Le dogme de la biologie moléculaire.....	24
1.2.2. Les ARN cellulaires	24
1.2.3. Les différents domaines de l'ARN messagers	26
1.3. Les thérapies basées sur l'ARN messenger.....	30
1.3.1. La découverte de l'ARNm	30
1.3.2. Les premiers systèmes de délivrance de l'ARNm.....	32
1.3.3. La transcription in vitro (IVT)	32
1.3.4. L'ADN et l'ARNm en thérapie	35
1.3.5. Les thérapies à base d'ARNm	36
1.3.6. L'immunogénicité de l'ARN messenger synthétique	37
1.3.7. La purification de l'ARNm.....	40
1.3.8. Les vaccins à ARNm approuvés.....	41
1.3.9. L'ingénierie de l'ARNm thérapeutique : Les axes d'amélioration et d'optimisation	41
CHAPITRE 2 : Vectorisation et délivrance des ARNm	44
2.1. Internalisation des vecteurs lipidiques par la cellule et mécanismes du trafic intracellulaire.....	45
2.1.1. Les voies d'endocytoses et le système endosomal	45
2.1.2. Les protéines Rab	48
2.1.3. L'échappement endosomal, un enjeu crucial des thérapies à base d'ARNm .	49
2.2. L'évolution des systèmes de délivrance lipidiques pour l'ARNm.....	51
2.2.1. Les liposomes cationiques	52

2.2.2. Des lipides cationiques aux lipides ionisables	55
2.2.3. Les nanoparticules lipidiques (LNP)	59
2.3. Les techniques de formulation et d'analyse des vecteurs lipidiques.....	66
2.3.1. Les techniques de formulation des vecteurs lipidiques	66
2.3.2. Les techniques d'analyse des vecteurs lipidiques	68
CHAPITRE 3 : L'ARNm en médecine régénérative, application au tissu osseux	74
3.1. La médecine régénérative.....	74
3.1.1. La thérapie cellulaire	75
3.1.2. La thérapie génique	76
3.2. La régénération osseuse : L'os et la réparation des défauts osseux	79
3.2.1. La biologie de l'os à l'échelle macroscopique	79
3.2.2. La biologie de l'os à l'échelle microscopique : les cellules osseuses	80
3.2.3. La réparation osseuse	81
3.3. Les stratégies thérapeutiques en régénération osseuse.....	83
3.3.1. Les greffes et les substituts osseux	83
3.3.2. Les Bone Morphogenetic Protein (BMP)	83
3.4. L'ARN messager en régénération osseuse.....	86
3.4.1. Acides nucléiques et régénération osseuse	86
3.4.2. ARNm et régénération osseuse	87
Problématique.....	91
Etude expérimentale	94
CHAPITRE 4 : Influence des lipides auxiliaires sur les performances et le trafic intracellulaire des LNP	95
1. Introduction.....	97
2. Materials and Methods.....	98
3. Results and Discussion	100
4. Conclusions.....	106
References	107
CHAPITRE 5 : Formulation des ARNm thérapeutiques : du Lip100 au LYX.....	115
5.1. Optimisation de l'expression des ARNm : stratégies et approches.....	115
5.1.1. Stratégies d'amélioration de l'expression des ARNm produits par IVT	115
5.1.2. Optimisation des conditions de transfection	118
5.1.3. Etude de l'ARNm NS1 pour l'amélioration de l'expression des ARNm	119

5.1.4. Etude des nucléotides modifiés pour l'amélioration de l'expression des ARNm	122
5.2. Production du vecteur : le Lip100,	125
5.2.1. Les lipides phosphoramidates	125
5.2.2. Les lipides phosphoramidates cationiques	125
5.2.3. Les lipides phosphoramidates ionisables	127
5.2.4. Le Lip100	127
5.3. Optimisation du vecteur : du Lip100 au LYX	129
5.3.1. Amélioration du stockage : la lyophilisation	129
5.3.2. Amélioration de la reproductibilité : l'extrusion	131
5.3.3. Amélioration des performances du LYX	132
CHAPITRE 6 : Caractérisation d'un vecteur lipidique, le LYX	137
1. Introduction	138
2. Materials and methods	140
3. Results	141
4. Discussion	147
5. Conclusion	148
CRedit authorship contribution statement	149
Appendix A. Supplementary data	149
Data availability	149
References	149
DISCUSSION GENERALE	157
CONCLUSION GENERALE	163
REFERENCES	165
Annexes - Congrès et brevets	181
2022	181
2023	181
2024	181

Liste des abréviations

5iC : **5**-**i**odo-**c**ytidine

5iU : **5**-**i**odo-**u**ridine

A : **A**dénine

ADN : Acide **d**ésoxyribo**n**ucléique

ADNc : **A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique **c**omplémentaire

ADNp : **A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique **p**lasmidique

AFM : **A**tomic **f**orce **m**icroscopy

ARE : **A**denylate uridylate-**r**ich **e**lement

ARNm : **A**cide **r**ibo**n**ucléique **m**essenger

BEND : **B**ranché **E**ndosomal **D**isruptor

BMP : **B**one **m**orphogenetic **p**rotein

C : **C**ytosine

cryoTEM : **C**ryo**g**enic **t**ransmission **e**lectron **m**icroscopy

Dlin-DMA : 1,2-dilinoyleoxy-n,n-dimethyl-3-aminopropane

Dlin-KC2-DMA : 2,2-dilinoylel-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolane

Dlin-KDMA : 2,2-dilinoylel-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane

Dlin-MC3-DMA : dilinoylelmethyl-4-dimethylaminobutyrate

DLS : **D**ynamic **l**ight **s**cattering

DODAP : 1,2-dioleoyloxy-3-(dimethyl amino) propane

DODMA : 1,2-dioleoyloxy-3-dimethylamino-propane

DOPE : 1,2-dielaidoyl phosphatidyl ethanolamine

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane

DOTMA : N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium

DSPC : 1,2-distearin sn-3-phosphorylcholine

EGFP : **E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein

ELS : **E**lectrophoretic **l**ight **s**cattering

EMSA : **E**lectrophoretic **m**obility **s**hift **a**ssay

ESEM : **E**nvironmental **s**canning **e**lectron **m**icroscopy

FBS : Fetal bovine serum
FDA : Food and drug administration
Fluc : Firefly Luciferase
G : Guanine
GAM : Gene activated matrix
HEK293 : Human embryonic kidney cells
HILIC : Hydrophilic interaction chromatography
HPLC : High performance liquid chromatography
IVT : Transcription in vitro
KLN25 : O,O-dioleoyl-N-(3 N-(N-methylimidazolium iodide)propylene) phosphoramidate
LFM : Lipofectamine MessengerMAX™
LncRNA : Long non-coding RNA
LNP : Lipids nanoparticles
miR : micro-RNA
MM27 : O,Odioleoyl-N-histamine phosphoramidate
MSC : Mesenchymal stem cells
Nanoluc : Nano luciferase
NTA : Nanoparticle tracking analysis
ORF : Open readng frame
OSX : Osterix
PAS : Polyadenylation site
PCR : Poly chain reaction
PDI : Polydispersity index
PEI : Polyéthylène imine
PIC : Preinitiation complexe
Rab : Ras-related in brain
RAM : RNA-activated matrix
RP-IP HPLC : Reversed-phase ion pair high performance liquid chromatograaphy
RSV : Virus respiratoire syncytial
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
s2U : 2-thiouridine
SEC : Size exclusion chromatography
siRNA : Small interfering RNA
T : Thymine

TAM : **T**ranscript-**a**ctivated **m**atrices

TEM : **T**ransmission **e**lectron **m**icroscopy

TISU : **T**ranslation **i**nitiator of **s**hort 5'**U**TR

U : **U**racile

uORP : **u**pstream **o**pen **r**eadin**g** **f**rame

UTR : **U**n**t**ranslated **r**egion

VEGF : **V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor

YFP : **Y**ellow **f**luorescent **p**rotein

Table des figures

Figure 1 : <i>Applications potentielles des thérapies à base d'ARNm (Y.-S. Wang et al. 2023).</i>	20
Figure 2 : <i>Structure des nucléotides, adapté de (« Nucléotide » 2024).</i>	22
Figure 3 : <i>Représentation des structures des acides nucléiques (primaire et secondaire) adapté de (« Structure secondaire d'un acide nucléique » 2023).</i>	23
Figure 4 : <i>Illustration du dogme de la biologie moléculaire, créé sur BioRender.com.</i>	24
Figure 5 : <i>Les ARN produits par la cellule, adapté de (Suleiman, Al-Chalabi, et Shaban 2024).</i>	24
Figure 6 : <i>La structure de l'ARN messenger, adapté de (Duan et al. 2022).</i>	26
Figure 7 : <i>Les coiffes de l'ARNm (cap 0, cap 1 and cap 2), adapté de (J. Zhang et al. 2023).</i>	27
Figure 8 : <i>Schéma de la traduction d'un ARNm dans une cellule eucaryote (Jia et Qian 2021).</i>	29
Figure 9 : <i>Découvertes et avancées clés dans l'évolution des thérapies à base d'ARNm, adapté de (Qin et al. 2022).</i>	31
Figure 10 : <i>Processus de préparation de l'ARNm IVT, d'après (Kwon et al. 2022).</i>	33
Figure 11 : <i>Différence d'expression entre l'ADN et l'ARNm, réalisé sur BioRender.com.</i>	35
Figure 12 : <i>De la délivrance de l'ARNm à l'activation de l'immunité, réalisé avec Biorender adapté de (Minnaert et al. 2021).</i>	37
Figure 13 : <i>Structure chimique des nucléosides modifiés étudiés par Karikó et al. 2005.</i>	38
Figure 14: <i>Production de cytokines par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) transfectées par différents ARN modifiés, d'après (Karikó et al. 2005).</i>	38
Figure 15 : <i>Co-transfection de cellules ostéoprogénitrices avec l'ARNm BMP-2 et l'ARNm NSI (P. Wang et al. 2020).</i>	39
Figure 16 : <i>Comparaison des structures chimiques de l'ARCA et de la CleanCap (Cap1), adapté de (Shin et al.).</i>	42
Figure 17 : <i>Illustration des éléments structuraux clés d'un ARNm synthétique et les stratégies d'optimisation possibles pour moduler sa stabilité, son efficacité de traduction et son immunogénicité (Rajendran, Amirthalingam, et Hwang 2022).</i>	43
Figure 18 : <i>Taille relative des particules internalisées par différentes voies d'endocytose (Danaei et al. 2018).</i>	45

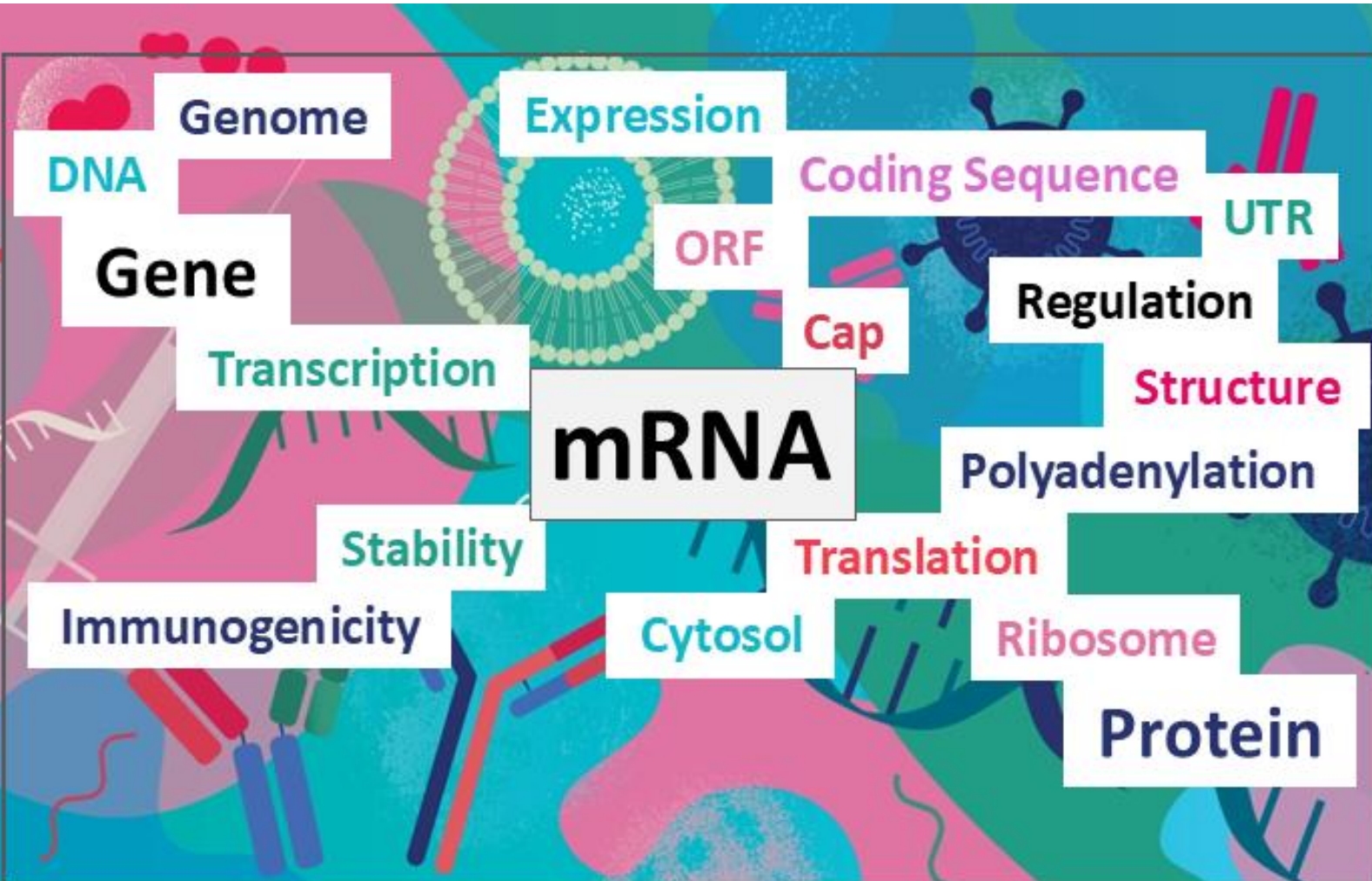
Figure 19 : <i>Trafic intracellulaire de vésicules, médié par les protéines Rab (Martinez-Arroyo et al. 2021).</i>	48
Figure 20 : <i>Illustration de la transition de phase de LNP dans l'endosome induisant la libération du cargo, adapté de (Chatterjee et al. 2024).</i>	50
Figure 21 : <i>Autoassemblage des lipides amphiphiles adapté de (Lasic 1998).</i>	51
Figure 22 : <i>Chronologie des principaux développements dans la formulation de l'ARN, de (Nele et al. 2024)</i>	52
Figure 23 : <i>Représentation de structures lamellaire (L_{α}), hexagonale (H_I) et hexagonale inversée (H_{II}) de lipoplexes (Allain, Bourgaux, et Couvreur 2012).</i>	53
Figure 24 : <i>Structures chimiques du DOTMA et du DOTAP, adapté de (Sun et Lu 2023).</i>	55
Figure 25 : <i>Structure chimique du DOTMA, et illustration de la composition de lipides synthétiques cationiques, de (Y. Zhang et al. 2021)</i>	56
Figure 26 : <i>Lipides cationiques et lipides ionisables, adapté de (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014).</i>	57
Figure 27 : <i>Evolution de la structure des lipides ionisables, de (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014). L'efficacité des lipides DLin-DMA et DLin-MC3-DMA a été comparée in vivo (voir figure 28).</i>	59
Figure 28 : <i>Amélioration des performances du DLin-MC3-DMA par rapport aux DLin-DMA pour diminuer le FVII in vivo, tiré de (Akinc et al. 2019).</i>	60
Figure 29 : <i>Composition de LNP pour la délivrance d'ARNm, de (« Get the Right Lipid Nanoparticle Formulation for Stability » 2024).</i>	61
Figure 30 : <i>Structure de phospholipides helpers couramment utilisés pour la formulation de nanoparticules lipidiques, phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), adapté de (Sun et Lu 2023)</i>	62
Figure 31 : <i>Effet de la géométrie des lipides sur leurs organisations, adapté de (Shah et al. 2020).</i>	63
Figure 32 : <i>Formules chimique du cholestérol et β-sitostérol, adapté de (Sun et Lu 2023).</i> ...	64
Figure 33 : <i>Criblage d'analogue du cholestérol pour l'amélioration de la délivrance d'ARNm adapté de (Patel et al. 2020).</i>	64
Figure 34 : <i>Stratégies de formulations de vecteurs à base de lipides (Nele et al. 2024).</i>	66
Figure 35 : <i>Stratégies de formulation de nanoparticules chargées d'ARN à base de lipides (Nele et al. 2024).</i>	67
Figure 36 : <i>Taille et PDI de 5 LNP, mesuré par DLS, de (Carrasco et al. 2021).</i>	69

Figure 37 : (A) Images de cryoTEM de complexes vecteurs/ARNm en phase lamellaire et (B) de complexes vecteur/siRNA en phase hexagonale, adapté de (Zheng et al. 2023). Barre d'échelle = 50nm.	71
Figure 38 : Caractérisation de différents LNP par CryoTEM et SAXS, de (Carrasco et al. 2021).	72
Figure 39 : Classification des cellules souches (ESCs: embryonic stem cells, hiPSC: human induced pluripotent stem cells, NSC: neural stem cells, HSC: hematopoietic stem cells, MSC: mesenchymal stem cells), adapté de (Sivandzade et Cucullo 2021).	75
Figure 40 : Illustration de la préparation et du mécanisme d'action des RAM, de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)	77
Figure 41 : Applications majeures des RAM (RNA activated matrix), adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)	78
Figure 42 : Illustration de la structure d'un os long, réalisé sur Biorender, adapté de (Serim et al. 2024)	80
Figure 43 : Illustration de la réparation d'un os long, adapté de (Einhorn et Gerstenfeld 2015)	82
Figure 44 : Stratégie de transfert de gène dans un défaut osseux, de (Evans 2010).	86
Figure 45 : Régénération osseuse induite par de l'ADN et de l'ARNm codant la protéine BMP-2, après 4 semaines d'implantation des matrices sur des rats (Elangovan et al. 2015).	87
Figure 46 : Nucléotides modifiés utilisés dans la conception de RAM, réalisé sur BioRender.com.	90
Figure 47 : Amélioration de la traduction des ARNm BMP-2 co-délivré avec l'ARNm NSI (P. Wang et al. 2020).	115
Figure 48 : Régénération osseuse en fonction de la dose d'ARNm, de (De La Vega et al. 2022).	116
Figure 49 : Production de BMP-2 au cours du temps, adapté de (Wen Zhang et al. 2019). .	117
Figure 50 : (A) Données brutes de cytométrie en flux, 24 h après transfection de cellule DC2.4 avec de l'ARNm EGFP. (B) Illustration et description des données recueillies, réalisé sur BioRender.com	118
Figure 51 : Efficacité de transfection en présence ou absence de l'ARNm NSI, 24h après transfection par la Lipofectamine MessengerMAX™, par cytométrie en flux.	120
Figure 52 : Cinétique d'expression de l'ARNm nanoluciférase délivré à l'aide de la LFM sur C2C12 BRELUC.	121

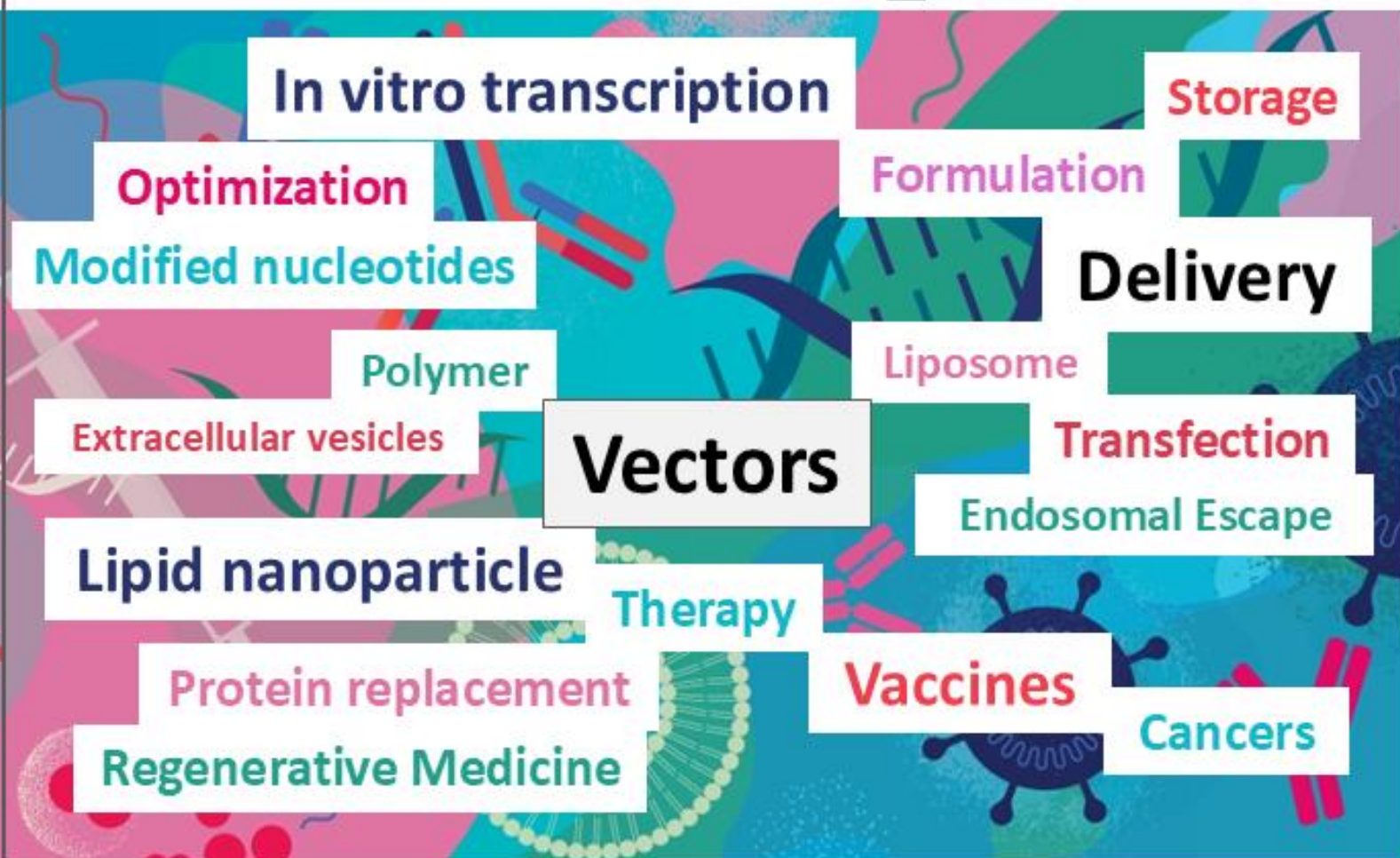
Figure 53 : Efficacité de transfection et cytotoxicité en fonction du type cellulaire, 24 h après transfection par le Lip100 ou la LFM	122
Figure 54 : Comparaison de la co-transfection de l'ARNm NS1 ou de l'incorporation de iodonucléotides pour la délivrance d'ARNm EGFP par cytométrie en flux	123
Figure 55 : Structure de l'imidazole et de l'ion imidazolium (PubChem).	126
Figure 56 : Efficacité de transfection des liposomes formulés à l'aide de lipides phosphoramidates (Mével, Breuzard, et al. 2008).	126
Figure 57 : Structure de lipides phosphoramidates cationique (KLN25) et ionisable (MM27).	127
Figure 58 : Analyse par microscopie électronique à balayage de RAM chargées de lipoplexes ou de lipopolyplexes, après lyophilisation. Adapté de (P. Wang et al. 2021).	128
Figure 59 : Illustration du protocole de formulation du lip100, réalisé sur BioRender.com	129
Figure 60 : Caractérisation de l'effet de la lyophilisation sur la taille, dispersité et performance des liposomes et lipoplexes à base de Lip100.	130
Figure 61 : Caractérisation des liposomes extrudés et des lipoplexes formulés.	131
Figure 62 : Cinétique d'expression de l'EGFP (haut) et la nanoluciférase (bas), après transfection de cellules C2C12 BRELUC par des lipoplexes à base de Lip100.	133
Figure 63 : Evaluation de l'efficacité de transfection et la cytotoxicité du LYX à différents rapport N/P, 24 h après transfection par cytométrie en flux.	134
Figure 64 : Cinétique d'expression de la firefly luciférase après injection de lipoplexes par voie intramusculaire.	135
Figure 65 : Résumé graphique de (Ngalle Loth et al. 2025).	137

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Evolution des dérivés de la Lipofectin® pour la délivrance d'acide nucléique. ..</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 2 : Techniques d'analyses et de contrôle qualité de l'ARNm, et des nanoparticules qui encapsulent l'ARNm, adapté de (Schoenmaker et al. 2021)</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 3 : Liste d'application thérapeutiques de RAM, adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 4 : RAM en régénération osseuse, adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023).....</i>	<i>88</i>
<i>Table 5 : Récapitulatif des conditions de transfection</i>	<i>118</i>



mRNA therapeutics



INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'approbation des vaccins à ARNm (acide ribonucléique messager) mis au point pour lutter contre la pandémie mondiale du COVID-19 la technologie de l'ARN connaît un succès international qui s'étend au-delà des laboratoires de recherche.

En 2020, les recherches menées pour lutter contre le virus SARS-CoV-2 responsable de la pandémie du COVID-19 se sont intensifiées. Plusieurs types de vaccins ont été testés, et ce sont finalement les vaccins à ARNm qui ont permis la réponse la plus rapide et la plus adaptable face à l'émergence des différents variants du virus. Cela a déclenché une augmentation fulgurante du nombre de brevets et de publications scientifiques portant sur les vaccins à ARNm.

En 2023, les docteurs Katalin Karikó (vice-présidente sénior chez BioNTech) et Drew Weissman (Professeur de médecine à l'université de Pennsylvanie) obtiennent le prix Nobel de physiologie ou médecine pour leurs travaux sur l'ARNm. Cette consécration est l'aboutissement d'un long travail de recherche. En effet, près de 15 ans avant la pandémie du COVID-19, en 2005, les deux chercheurs ont constaté que la modification chimique de l'ARNm de synthèse permet de fortement augmenter son activité thérapeutique (Karikó et al. 2005). Leurs travaux ont notamment permis de lutter contre le COVID-19 en permettant la mise en œuvre de vaccins efficaces, produits par Pfizer-BioNtech et Moderna, dans lesquels de l'ARNm codant la protéine Spike du SARS-CoV-2 est complexé et administré sous forme de nanoparticules lipidiques (LNP).

Toutefois, les travaux dédiés au développement de produits thérapeutiques à base d'ARNm s'étendent au-delà du domaine de la vaccination. Ces recherches englobent notamment le traitement de maladies génétiques, les thérapies anticancéreuses, ainsi que la médecine régénérative, avec un potentiel d'applications encore plus vaste (Figure 1).

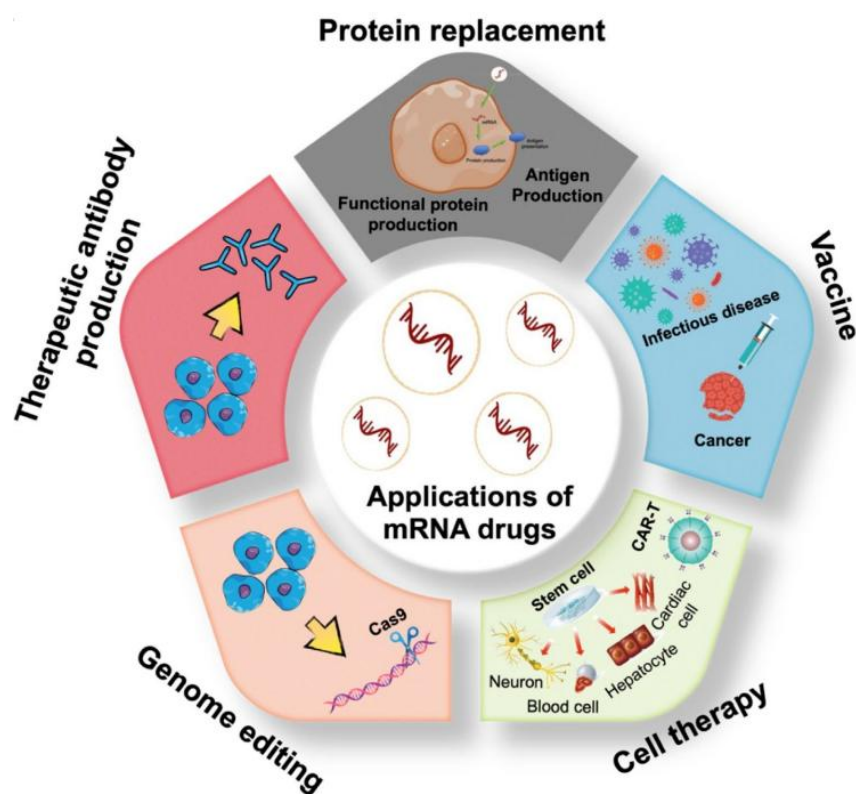


Figure 1 : *Applications potentielles des thérapies à base d'ARNm (Y.-S. Wang et al. 2023).*

Cependant, les défis techniques tels que la faible stabilité et la mauvaise internalisation cellulaire de l'ARNm ont pendant longtemps limité les avancées des chercheurs. En effet, l'ARNm, peu stable, peut être dégradé avant de pouvoir exprimer son message, ce qui réduit grandement son effet thérapeutique (Hopkins, 2021). Par conséquent, les nouvelles avancées dans le domaine des systèmes de délivrance d'acides nucléiques, notamment les LNP qui encapsulent l'ARNm, le protègent et le délivrent au site d'intérêt, ont permis de surmonter ces limites, permettant le développement de thérapies performantes.

Ainsi, les travaux pionniers des Dr. Katalin Karikó et Dr. Drew Weissman, couplés aux récents systèmes de délivrance d'ARNm plus performants que les systèmes préexistants, ont permis de propulser la technologie de l'ARNm à l'avant-garde des thérapies innovantes.

Poursuivre la recherche dans ce domaine permet d'approfondir nos connaissances sur les interactions moléculaires liées à l'utilisation et la délivrance d'ARNm. En effet, plusieurs aspects cruciaux nécessitent une attention particulière, tels que, la biocompatibilité, la stabilité, le stockage de longue durée, ainsi que les performances des formulations. Ces éléments représentent des enjeux majeurs à aborder pour contribuer à l'amélioration des thérapies à base d'ARNm.

Dans cette thèse, nous explorerons les problématiques de la délivrance de l'ARNm en nous focalisant sur deux vecteurs lipidiques : les nanoparticules lipidiques (LNP) et les liposomes cationiques. Enfin, nous étudierons l'administration d'ARNm à visée thérapeutique en médecine régénérative, en prenant comme exemple leurs effets sur la signalisation ostéogénique.

Avant de porter notre attention sur les vecteurs, nous allons nous intéresser à l'ARN messenger.

CHAPITRE 1 : Les thérapies à base d'ARNm

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter brièvement la structure de l'ARN cellulaire endogène, pour faciliter la compréhension des sections suivantes. Ensuite, nous discuterons plus en détails de l'ARN messager synthétique employé en thérapie.

1.1. Introduction à l'ARN

L'acide ribonucléique (ARN), comme l'acide désoxyribonucléique (ADN), est un acide nucléique. Il s'agit d'un polymère constitué de nucléotides.

1.1.1. Nucléosides et nucléotides

Un nucléoside est constitué d'une base azotée : adénine (A), guanine (G), thymine (T), uracile (U) ou cytosine (C), et d'un pentose : ribose ou désoxyribose (figure 2). On retrouve essentiellement le ribose dans l'ARN et le désoxyribose dans l'ADN.

Les nucléotides, sont des nucléosides phosphorylés par un, deux ou trois groupements phosphate en position 5' du pentose.

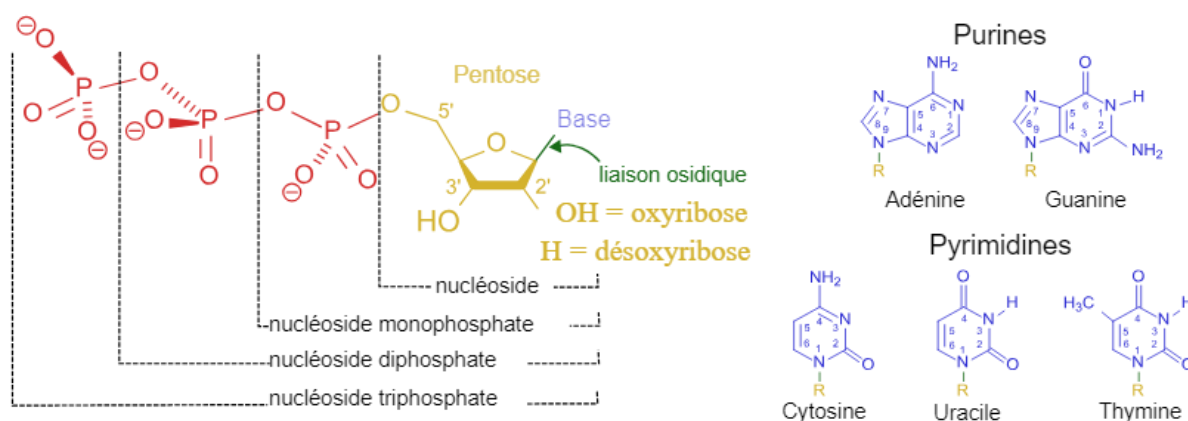


Figure 2 : Structure des nucléotides, adapté de (« Nucléotide » 2024).

Les nucléotides sont reliés les uns aux autres par une liaison 5'-3' phosphodiester pour former un brin d'acide nucléique. Un groupement phosphate relie le groupement hydroxyle (-OH) en position 3' du pentose du premier nucléotide, avec le groupement hydroxyle en position 5' du second nucléotide. Ainsi, un acide nucléique possèdera à une extrémité un nucléotide avec un groupe phosphate libre (5'-P), et à l'autre extrémité un groupe hydroxyle libre (3'-OH). Par

convention, l'écriture de séquences d'acide nucléique se fait dans le sens 5'→3' (*Biochimie* 2025).

1.1.2. Différences entre ARN et ADN

La présence de la fonction 2'-OH sur le ribose de l'ARN le rend instable en milieu alcalin, à la différence de l'ADN qui en est dépourvu. Néanmoins, ce n'est pas le seul élément structural qui différencie les deux macromolécules. En effet, l'ADN est composé des bases complémentaires : l'adénine (A) s'associant avec la thymine (T) et la cytosine (C) avec la guanine (G). L'ARN ne contient pas de thymine ; l'adénine (A) y est appariée à l'uracile (U), tandis que la cytosine (C) reste complémentaire de la guanine (G). Une autre différence est que l'ADN se présente sous forme de double brin, la fameuse double hélice antiparallèle, où les deux brins possèdent une polarité opposée. En revanche, l'ARN est constitué d'un seul brin, qui, à la différence de l'ADN, forme des liaisons intramoléculaires pouvant être parallèles ou antiparallèles, en se repliant sur lui-même.

1.1.3. Les structures de l'ARN

Les caractéristiques chimiques de l'ARN induisent une plus grande souplesse en termes de structure par rapport à l'ADN. En effet, les brins d'ARN peuvent adopter différentes structures secondaires comme les hélices (parallèles ou antiparallèles), les tiges-boucles ou les pseudonœuds (figure 3). Ces structures sont, pour certaines, stabilisées par des appariements de bases non canoniques que l'on retrouve essentiellement dans l'ARN.

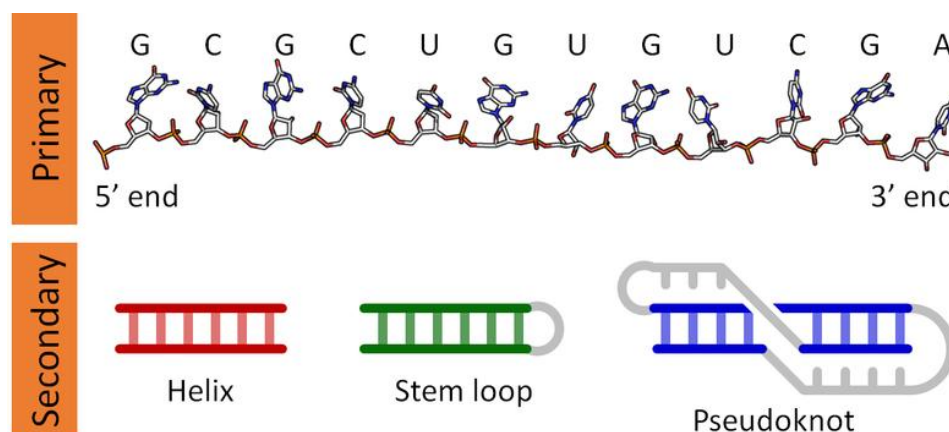


Figure 3 : Représentation des structures des acides nucléiques (primaire et secondaire)
adapté de (« Structure secondaire d'un acide nucléique » 2023).

1.2. Les ARN cellulaires et l'ARN messager endogène

1.2.1. Le dogme de la biologie moléculaire

Selon le dogme de la biologie moléculaire (figure 4), l'information génétique est stockée sous forme de gènes dans l'ADN et est transmise via l'ARN, pour être traduite en protéines (Crick 1970).

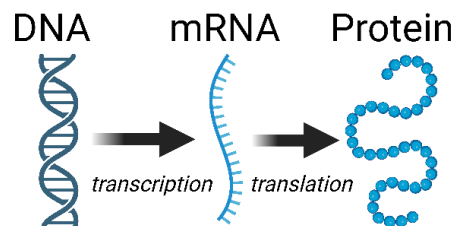


Figure 4 : Illustration du dogme de la biologie moléculaire, créé sur BioRender.com.

Dans un premier temps, l'ADN est transcrit sous forme d'ARN par l'ARN polymérase au cours de la **transcription**. Dans un second temps, au cours de la **traduction**, l'ARNm mature va permettre la production de protéines, essentielles à l'exécution des fonctions cellulaires (figure 4 et figure 8).

1.2.2. Les ARN cellulaires

On distingue plusieurs types d'ARN, synthétisés par différentes ARN polymérases (I, II ou III). Ces ARN, sont de différentes tailles et possèdent des fonctions variées (figure 5).

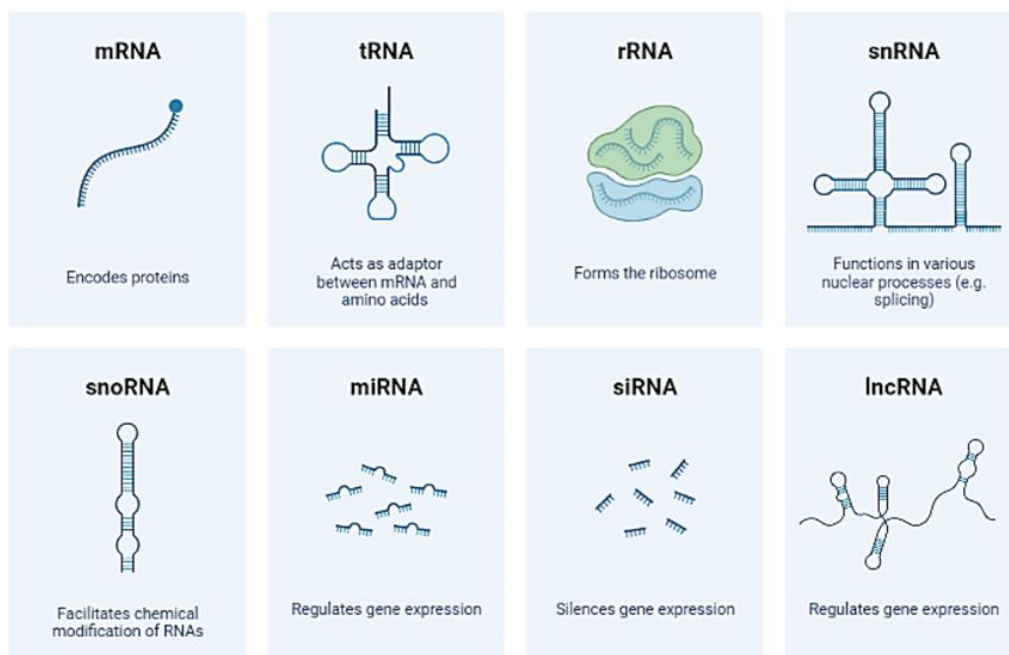


Figure 5 : Les ARN produits par la cellule, adapté de (Suleiman, Al-Chalabi, et Shaban 2024).

La taille d'un ARN peut aller d'une vingtaine de nucléotides pour les siRNA (Lemoine et Courbebaisse 2022), à plus de 90 000 nucléotides pour l'ARNm de la titine. Outre un large intervalle de tailles, les ARN se distinguent aussi par la diversité de rôles qu'ils peuvent adopter. Une dizaine de sous-catégories d'ARN sont réparties au sein de deux grandes familles, les ARN non codants et les ARN codants.

Les **ARN non codants** sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la synthèse des protéines : ARN ribosomiques (ARNr) et ARN de transfert (ARNt). Mais aussi la régulation de l'expression des gènes : ARN long non codant (lncRNA), les micro-ARN (miR) et « small interfering RNA » (siRNA). Des ARN sont aussi impliqués dans la maturation d'autres ARN : « small nuclear RNA » (snRNA).

On note que les ARNr représentent 80% des ARN totaux de la cellule contre 10 à 15% pour les ARNt et moins de 1% pour les autres sous catégories (*Biochimie* 2025).

Les **ARN codants**, qui constituent à peu près 5% des ARN totaux de la cellule, sont uniquement composés des ARN messagers. Ils sont le produit de la transcription d'un gène à partir de l'ADN et servent de matrice pour la production des protéines, par le ribosome, au cours de la traduction (figure 8).

La transcription des ARNm est réalisée par l'ARN polymérase II. Le pré-messager qui en résulte est modifié de manière post-transcriptionnelle. Une coiffe lui est ajoutée en 5', et une queue en 3'. Aussi, il est épissé, les introns sont éliminés et les exons sont assemblés. Il en résulte un ARNm mature.

La régulation post-transcriptionnelle est un aspect essentiel de l'expression génique car elle module la composition du protéome. En effet, les ARN messagers sont régulés différemment les uns par rapport aux autres, ce qui implique de larges variations au niveau de leur stabilité et de leur traduction. Par exemple, l'efficacité de la traduction et la demi-vie peuvent varier d'un ordre de grandeur de 10^3 entre les transcrits (Passmore et Collier 2022).

1.2.3. Les différents domaines de l'ARN messagers

Dans cette partie nous nous intéressons particulièrement aux ARNm eucaryotes. Ces ARN messagers sont composés de plusieurs domaines agissant directement ou indirectement sur la régulation de l'expression du transcrit :

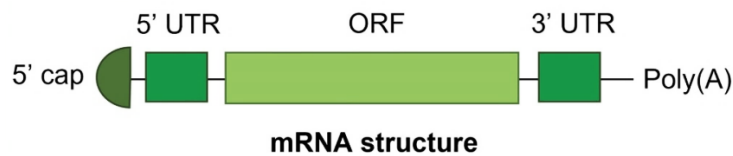


Figure 6 : La structure de l'ARN messenger, adapté de (Duan et al. 2022).

La coiffe

C'est l'extrémité 5' de l'ARNm mature (figure 6). Il existe différents types de coiffes (cap0, cap1 et cap2) qui se distinguent par leurs degrés de méthylation (figure 7). Chez l'être humain, les cap0 et cap1 sont courantes, tandis que la cap2 est plus rare (Furuichi et al. 1975; Smietanski et al. 2014).

La coiffe cap0 est constituée d'une 7-méthylguanosine (m7G) liée au premier nucléotide du messenger par une liaison 5'-5' triphosphate, différente de la liaison 5'-3' classique vue précédemment.

La coiffe cap1 possède une méthylation supplémentaire. Outre la méthylation de la guanosine en position N7, elle présente une méthylation en position 2'-O du ribose du premier nucléotide transcrit, généralement une base purique. Les ARNm dépourvus de coiffe ou arborant une cap0 sont susceptibles d'être détectés par les récepteurs cellulaires de l'immunité innée, tandis que les ARNm dotés d'une coiffe cap1 échappent à cette détection. Par conséquent, la cap1 joue un rôle crucial dans la modulation de la reconnaissance des ARNm par le système immunitaire inné. Les fonctions de la coiffe ne se limitent pas à fournir une signature moléculaire permettant de différencier le soi du non soi. Elle octroie aussi une protection à la dégradation par les exonucléases 5'→3'. De plus, elle permet l'export des ARNm matures du noyau vers le cytosol. La coiffe est aussi impliquée dans la traduction en interagissant avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Jia et Qian 2021).

La coiffe cap2 présente une méthylation en position 2'-O sur les deux premiers nucléotides qui suivent la 7-méthylguanosine (figure 7). Cette coiffe, plus élaborée, et plus rare dans la cellule, permet d'optimiser les fonctions générales de protection, d'export, de traduction, et d'évasion immunitaire associées aux coiffes des ARNm (Chan et al. 2023).

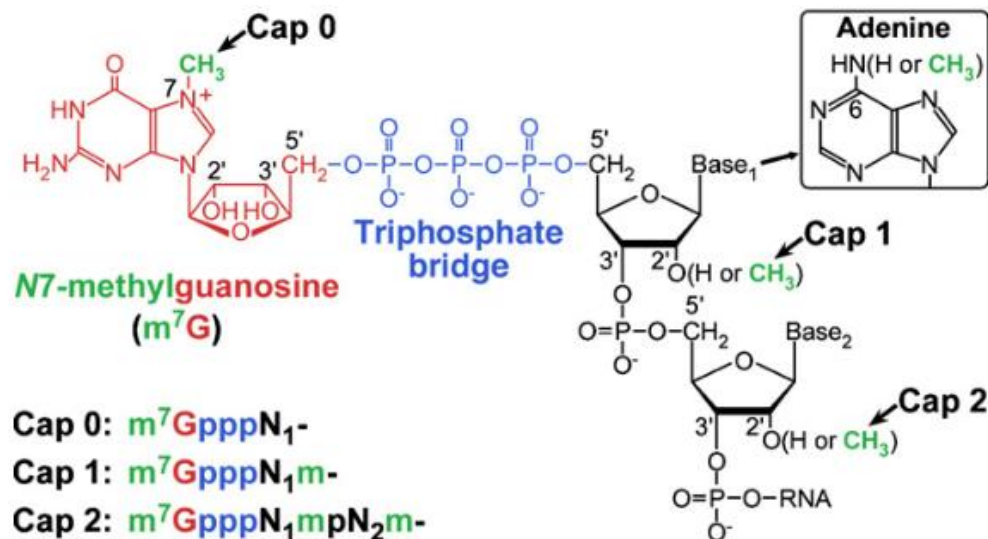


Figure 7 : Les coiffes de l'ARNm (cap 0, cap 1 and cap 2), adapté de (J. Zhang et al. 2023).

La région 5'UTR (untranslated region)

Non traduite par le ribosome, cette région possède un rôle dans la régulation de l'initiation de la traduction. Chez les eucaryotes, on y retrouve la séquence « Kozak », un motif nucléotidique considéré comme le site d'initiation de la traduction (Khalid et Poh 2023). La complexité des structures secondaires du 5'UTR influence le scanning du ribosome, modulant ainsi l'initiation de la traduction.

L'ORF (open reading frame)

C'est la région codante de l'ARNm qui sert de matrice au ribosome pour la production de protéines d'intérêt. L'ORF ou « coding sequence » (CDS) est délimitée par le codon start en amont et le codon stop en aval.

La région 3'UTR

A l'instar du 5'UTR, le 3'UTR n'est pas traduit par le ribosome, mais possède un rôle de régulation majeur. Il est impliqué dans la stabilité de l'ARNm, sa localisation subcellulaire et sa traduction. Dans le 3'UTR on retrouve des séquences très conservées au sein des organismes, comme les « AU-rich elements » (ARE), correspondants au motif suivant « AUUUA ». L'interaction des « AU-binding proteins » (AUBPs) avec les ARE induisent le recrutement d'un système de dégradation de l'ARNm, régulant son expression. Il existe d'autres motifs qui induisent des réponses variées en fonction du facteur associé. Enfin le 3'UTR joue aussi un rôle dans la localisation de l'expression des ARNm (Passmore et Collier 2022).

La queue poly(A)

Elle est présente à l'extrémité 3' des messagers chez presque tous les eucaryotes. Quelques exceptions sont connues comme les ARNm des histones de mammifère, et l'ARNm du gène MALAT1 (Wilusz et al. 2012). Les queues poly(A) sont constituées de 200 à 250 adénosines, ajoutées après clivage de l'ARN pré-messager. La queue est requise pour l'export des ARNm mature dans le cytoplasme (Passmore et Collier 2022). Sa longueur est importante car toute modification du nombre d'adénosines ajoutées peut conduire à la rétention des ARNm dans le noyau et pourrait entraîner leur dégradation (Tudek, Lloret-Llinares, et Jensen 2018).

Les queues fournissent un site de liaison à de multiples protéines comme les « poly (A) binding protein » (PABP). La queue, associée à certaines protéines, module la dégradation enzymatique des ARNm. De plus, elle joue un rôle important dans la traduction. En effet, des interactions entre les protéines liées à la coiffe (eIF4G) et celles liées à la queue (PABP) induisent une cyclisation de l'ARNm favorisant l'initiation de la traduction et le recyclage du ribosome (Jia et Qian 2021).

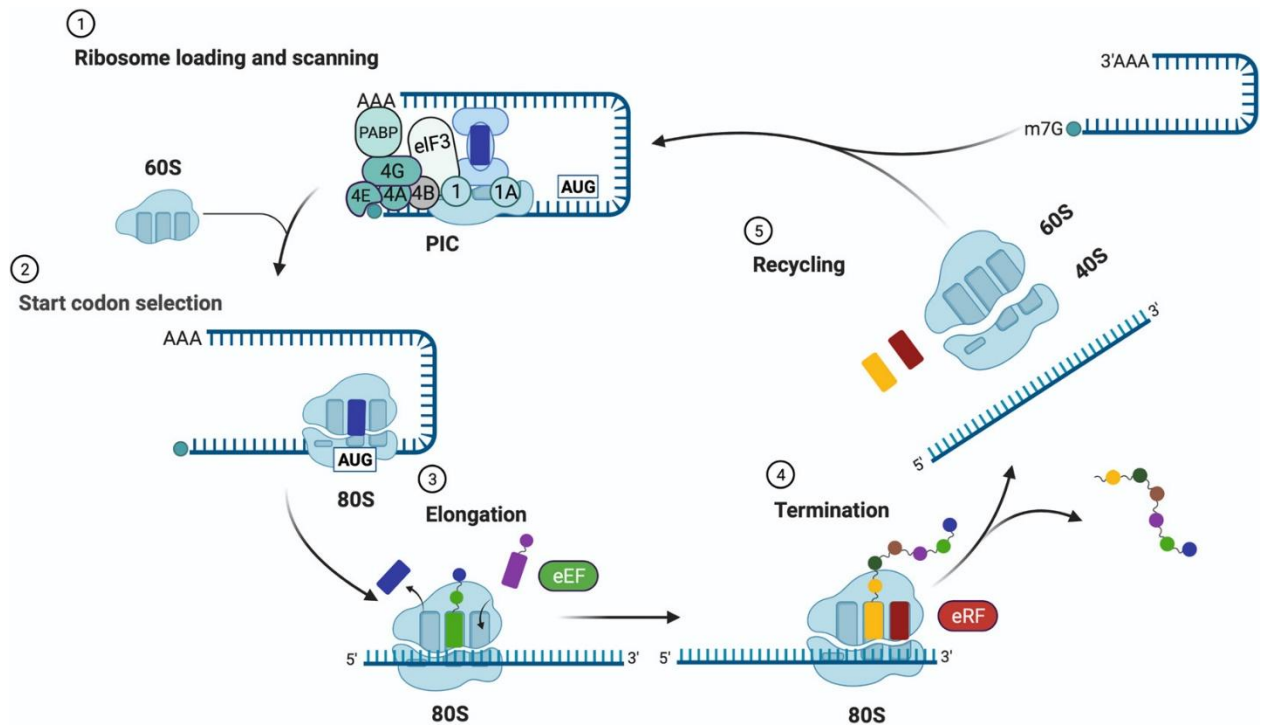


Figure 8 : Schéma de la traduction d'un ARNm dans une cellule eucaryote (Jia et Qian 2021).

Comme nous avons pu le voir, l'expression des ARNm est fortement régulée. En effet, leur demi-vie ou leur traduction est modulable, et cela à différents niveaux, notamment via des éléments de cis-régulation tels que les UTR ou la queue poly(A).

Il est nécessaire de prendre ses paramètres en compte pour la production d'ARN messagers de synthèse.

1.3. Les thérapies basées sur l'ARN messenger

Les thérapies basées sur l'ARN messenger exploitent le mécanisme de traduction cellulaire pour induire la production de protéines d'intérêt par les cellules ciblées. Cette technologie, aujourd'hui efficace et prometteuse, est le fruit de décennies de recherches, de découvertes, d'innovations et d'avancées majeures que nous allons décrire dans la section suivante.

1.3.1. La découverte de l'ARNm

L'ARN messenger a été découvert en 1961 par François Jacob (1920-2013), André Lwoff (1902-1994) et Jacques Monod (1910-1976). Au cours des années 50, les scientifiques avaient identifiés le rôle et la structure de l'ADN (Watson et Crick 1953). Ils savaient aussi que le ribosome était impliqué dans la production des protéines (Brenner, Jacob, et Meselson 1961) mais ignoraient le lien entre ADN et protéines. Dans ce contexte, leurs travaux représentent donc une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Ces travaux englobent la découverte de l'ARN messenger, mais aussi sa structure et ses fonctions supposées. En effet, les chercheurs émettent l'hypothèse qu'il existe un intermédiaire instable qualifié de « messenger », qui transmettrait l'information des gènes vers le ribosome pour la synthèse des protéines. Ils suspectent que ce messenger, serait un polymère de nucléotide avec une structure proche de celle de l'ADN, mais avec un poids moléculaire supérieur à celui des ARNt (Jacob et Monod 1961). Ces travaux initient la recherche sur l'ARNm.

Le développement de thérapies à base d'ARNm peut être divisé en trois périodes. La première s'étend de 1961 à 1990 et vise à comprendre les structures et fonctions de l'ARNm. Cette période englobe sa découverte, sa synthèse en laboratoire, et la production des premiers systèmes de délivrance (figure 9). En effet, au cours des années 70, des avancées majeures sont faites dans la compréhension de la structure et des fonctions de l'ARNm. On découvre notamment l'existence des régions non traduites (UTR), de la queue polyA et de la coiffe des ARNm. Par la suite, des analogues de coiffes seront développés et commercialisés.

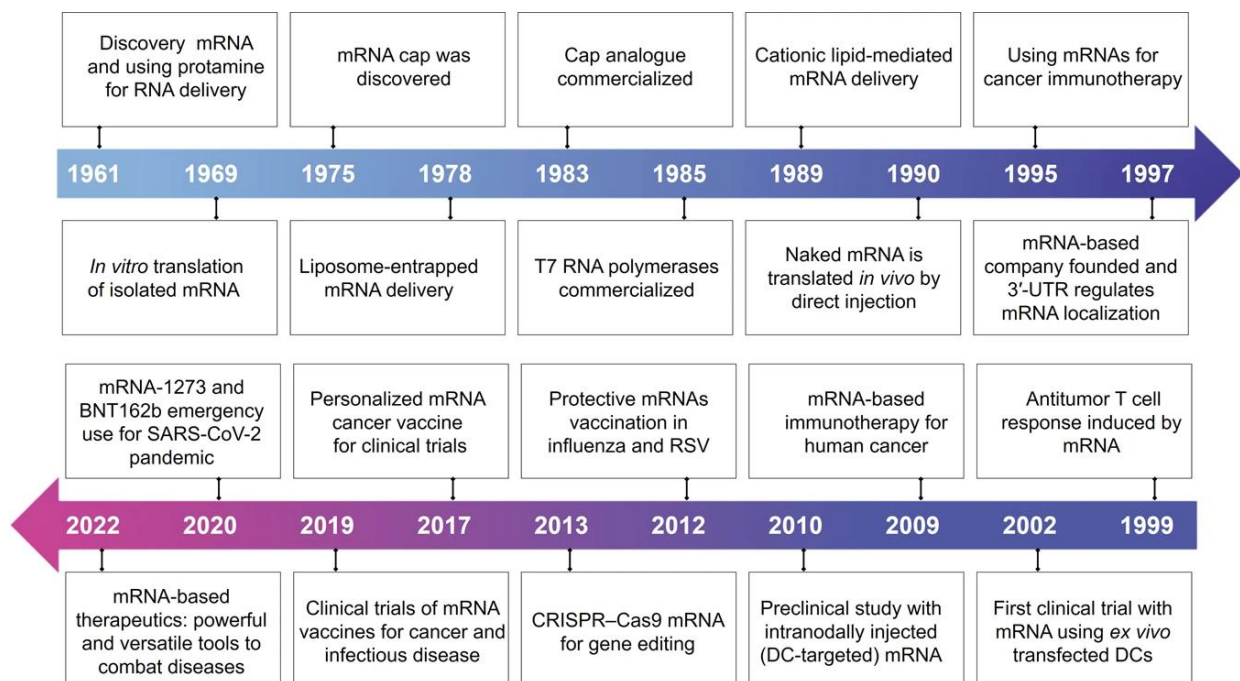


Figure 9 : Découvertes et avancées clés dans l'évolution des thérapies à base d'ARNm, adapté de (Qin et al. 2022).

1.3.2. Les premiers systèmes de délivrance de l'ARNm

De nombreuses techniques sont utilisées dans les années 1970 pour délivrer des acides nucléiques dans les cellules, comme la formulation de complexes avec du phosphate de calcium, ou encore l'utilisation de polymères cationiques tels que le DEAE-dextran ou la poly-lysine. D'autres techniques comme l'électroporation, les vecteurs viraux, la micro-injection ou même l'utilisation des acides nucléiques nus, sont aussi largement répandues (Lane, Marbaix, et Gurdon 1971). Les techniques de transfection d'ARNm s'inspirent des méthodes développées pour délivrer de l'ADN. En effet, il est important de noter qu'à l'époque, la recherche sur l'ADN était bien plus populaire en raison de sa stabilité, de son moindre coût et de son intégration possible dans le génome.

En revanche, en ce qui concerne l'ARNm, plusieurs obstacles ralentissaient considérablement les chercheurs, notamment sa faible stabilité, et l'utilisation d'ARNm uniquement issu de lysats cellulaires.

En 1978, pour la première fois, de l'ARNm est délivré dans une cellule, *in vitro*, par un liposome et permet la production de protéine d'intérêt (Ostro et al. 1978; Dimitriadis 1978).

Puis, dans les années 1980, des avancées majeures sont réalisées dans le domaine de la transcription *in vitro*, permettant de synthétiser de grandes quantités d'ARNm en utilisant des polymérases de bactériophage (Studier et Moffatt 1986).

1.3.3. La transcription in vitro (IVT)

La transcription *in vitro* (IVT) est catalysée par une ARN polymérase - ADN dépendante et résulte en la production de l'ARNm d'intérêt. Ces enzymes utilisent le promoteur présent sur l'ADN double brin linéaire comme matrice pour produire l'ARNm. L'ADN matrice peut alors être un plasmide linéarisé à l'aide d'enzymes de restrictions, ou un produit de PCR.

L'ARN polymérase la plus utilisée est l'ARN polymérase T7, issue du bactériophage T7. Elle possède de nombreux avantages. Tout d'abord, la T7 est généralement peu coûteuse et possède une spécificité accrue pour son promoteur (le promoteur T7). De plus, elle démontre une efficacité élevée, avec des rendements de synthèse qui peuvent être supérieurs à ceux des autres polymérases. Ainsi, elle permet d'obtenir une quantité d'ARNm plus importante pour une quantité d'ADN matrice initiale équivalente.

D'autres ARN polymérases, aussi issues de bactériophages peuvent être employées, comme la polymérase SP6 ou la polymérase T3.

Aujourd'hui, l'IVT est une technique rapide, qui peut facilement être employée à petite échelle en laboratoire académique, ou à grande échelle pour la production de millions de doses de vaccins (J. Zhang et al. 2023).

Le choix de la protéine codée dans l'ORF est un prérequis. L'ADN matrice contenant la séquence codante de la protéine d'intérêt, sous la dépendance d'un promoteur (ex : T7), est ajoutée à la réaction qui contient les ribonucléotides et l'enzyme.

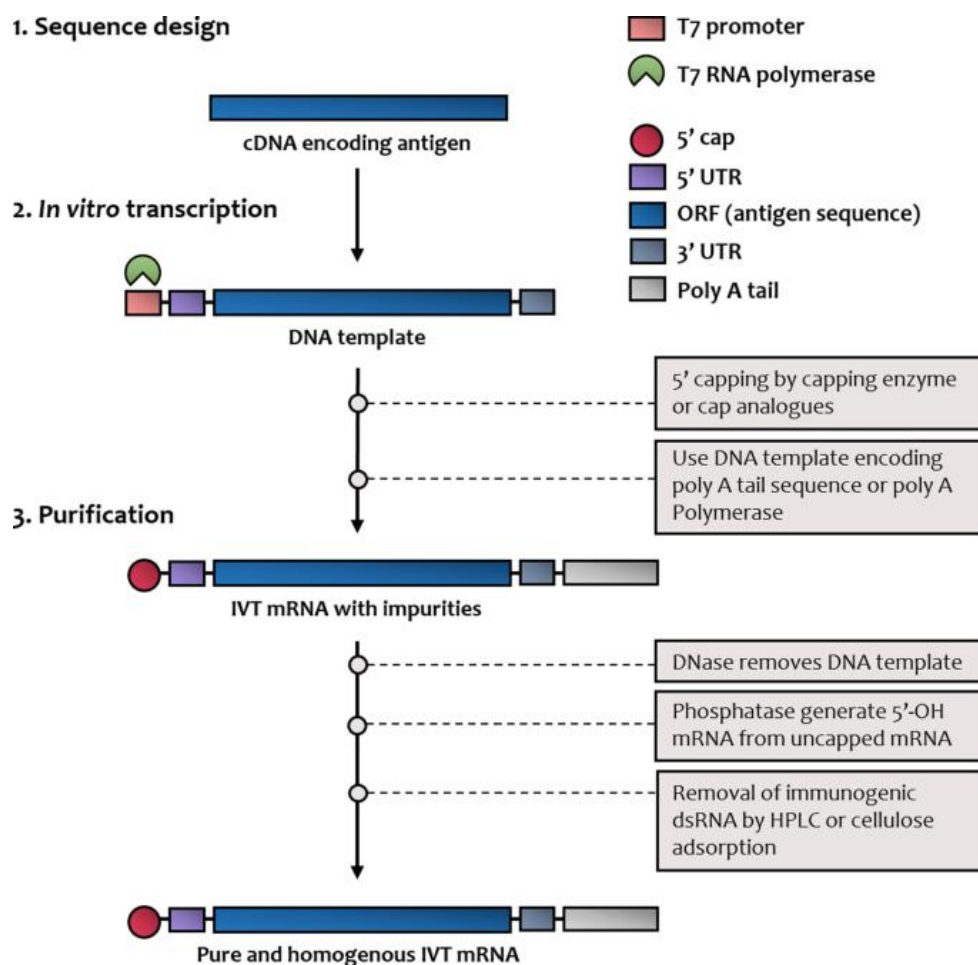


Figure 10 : *Processus de préparation de l'ARNm IVT, d'après (Kwon et al. 2022).*

L'ajout de la coiffe peut se faire pendant l'IVT (co-transcriptional capping) ou après l'IVT (post-transcriptional capping). L'analogue de coiffe le plus répandu est l'ARCA (anti-reverse cap analog). En termes de fonction, cette coiffe synthétique est équivalente à une cap 0.

Aussi, la queue polyA peut être codée via une cassette présente sur l'ADN matrice, ou elle peut être ajoutée via une étape supplémentaire, après l'IVT. L'ARNm synthétisé est ensuite purifié, sa qualité est contrôlée, puis il est stocké en solution à -80°C.

En somme, l'IVT a considérablement facilité la progression des chercheurs, et est aujourd'hui utilisée en routine pour la production d'ARNm à différentes échelles.

En conséquence, cette période (1961 - 1990) fut marquée par de grandes découvertes et le développement de nouvelles techniques. La possibilité de produire de l'ARNm *in vitro* (IVT) et la formulation de systèmes de délivrance plus performants, comme les liposomes cationiques (Felgner et al. 1987; Malone, Felgner, et Verma 1989), ont généré un intérêt croissant pour l'ARNm. En effet, l'ARNm permettait d'atteindre des niveaux de transfection plus élevés que l'ADN dans certains types cellulaires.

Toutefois, malgré la possibilité de le synthétiser en laboratoire, l'ARNm était encore trop instable pour générer un intérêt important en thérapie. Il faudra attendre 1990 pour que de l'ARNm produit par IVT soit traduit *in vivo* (Wolff et al. 1990), marquant un tournant dans l'histoire de la recherche sur l'ARN messager.

En effet, tandis que cette première période (1961-1990) était en majorité consacrée à la recherche fondamentale, les travaux de Wolff *et al.* favorisent une transition vers la recherche appliquée basée sur l'ARNm. L'idée d'utiliser de l'ARNm comme molécule thérapeutique se concrétise lorsqu'ils ont démontré que l'injection d'ARNm transcrit *in vitro* (IVT) ou d'ADN plasmidique (ADNp) dans le muscle de souris, sans système de délivrance, entraînait l'expression de la protéine d'intérêt. A noter que dans certains cas, une expression de plus de deux mois a été observée (Wolff et al. 1990).

1.3.4. L'ADN et l'ARNm en thérapie

Comme l'ARNm est moins stable que l'ADN, l'attention portée aux travaux de Wolff *et al.*, ainsi que les recherches dans le domaine, se sont initialement concentrées sur les technologies basées sur l'ADN. Or, en fonction de l'application finale, le fait que l'ARNm ait une expression transitoire, car totalement dégradé par les voies métaboliques physiologiques, peut représenter un avantage. En effet, il existe plusieurs différences importantes entre les approches thérapeutiques basées sur l'ARNm et celles basées sur l'ADN.

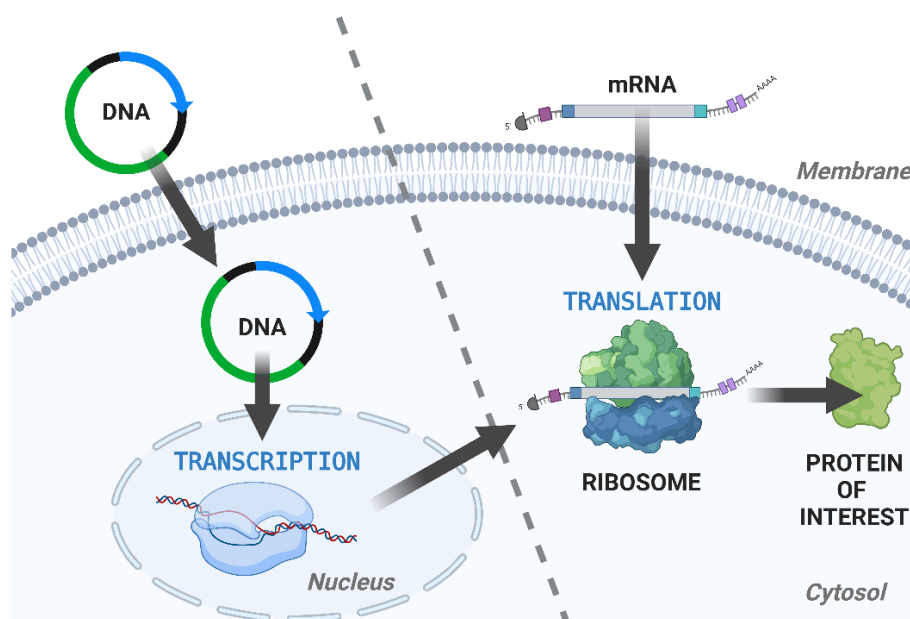


Figure 11 : Différence d'expression entre l'ADN et l'ARNm, réalisé sur BioRender.com.

L'ADN thérapeutique doit accéder au noyau pour être transcrit en ARN, et son efficacité dépend généralement de l'état de prolifération des cellules cibles. En revanche, l'ARNm n'a pas besoin d'atteindre le noyau car il est rapidement traduit lorsqu'il a atteint le cytoplasme (voir figure 11). Il peut donc s'exprimer dans des cellules différenciées, qui prolifèrent peu, ce qui est difficilement le cas pour l'ADN (Karra et Dahm 2010). De plus, contrairement à l'ADN, aucune étude ne démontre que l'ARNm peut s'intégrer dans le génome. De ce fait, son utilisation en thérapie ne présente pas de risque de mutagenèse lié aux insertions aléatoires dans le génome (Sahin, Karikó, et Türeci 2014). En conséquence, en fonction des applications, l'ARNm peut représenter une alternative attractive par rapport à l'ADN du fait de sa polyvalence, et de son expression plus directe, bien que transitoire.

1.3.5. Les thérapies à base d'ARNm

A partir des années 1990, la recherche sur l'ARNm entre dans une nouvelle période au cours de laquelle elle se développe en s'appuyant sur les grandes découvertes de la période précédente, et sur les nouvelles techniques de synthèse et de formulation des ARNm.

Durant cette seconde période, qui s'étend également sur une trentaine d'années (1990 à 2019), les connaissances s'accumulent et les premières études précliniques voient le jour. Des avancées majeures sont réalisées, notamment en immunothérapie où l'ARNm apparaît comme une alternative innovante aux méthodes traditionnelles employées dans le domaine de la vaccination ou de la recherche contre les cancers.

En 1993, une étude française présente le premier exemple de vaccin à ARNm. Des souris sont immunisées, pour la première fois, avec de l'ARNm codant pour une protéine du virus de la grippe. Cet ARNm délivré à l'aide d'un liposome permet l'activation des lymphocytes T cytotoxique, induisant une reconnaissance similaire à l'immunisation classique utilisant le pathogène (Martinon et al. 1993).

Deux ans plus tard, un ARNm codant un antigène tumoral a induit la production d'anticorps chez la souris, démontrant le potentiel des vaccins ARNm dans les thérapies anticancéreuses (Conry et al. 1995). Ces travaux représentent de grandes avancées quant à l'utilisation de l'ARNm en vaccination infectieuse (1993) et antitumorale (1995).

Dans les années 2000, des essais cliniques innovants de thérapies ex-vivo, utilisant des cellules dendritiques transfectées par de l'ARNm, sont mis en œuvre (Heiser et al. 2002). Ces avancées donneront lieu à la production d'un vaccin disponible aux Etats-Unis, le « Sipuleucel-T » de Provenge® (Anassi et Ndefo 2011), pour traiter les stades avancés de cancer de la prostate.

En 2005, les recherches de Katalin Karikó et Drew Weissman, récompensés du prix Nobel pour leurs travaux, ont démontré que l'utilisation de nucléotides modifiés permet d'améliorer le potentiel thérapeutique des ARN messagers (Karikó et al. 2005). Ces recherches ont révolutionné la conception des vaccins à ARNm.

1.3.6. L'immunogénicité de l'ARN messager synthétique

Une fois délivré dans le cytosol, l'ARNm est pris en charge par le ribosome qui produit la protéine d'intérêt. Cependant, l'immunogénicité élevée de l'ARN messager peut limiter ses performances (figure 12). En effet, il a été démontré que l'ARNm synthétique, exogène produit par IVT peut être reconnu par les récepteurs cellulaires et induire une production d'interférons de type I (IFN α , IFN β) ainsi que de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6). Cette réaction provoque une inhibition de la traduction et peut entraîner la dégradation des ARN cellulaires. Par conséquent, les ARNm transfectés seront peu traduits, limitant la quantité de protéines thérapeutiques produites (Minnaert et al. 2021).

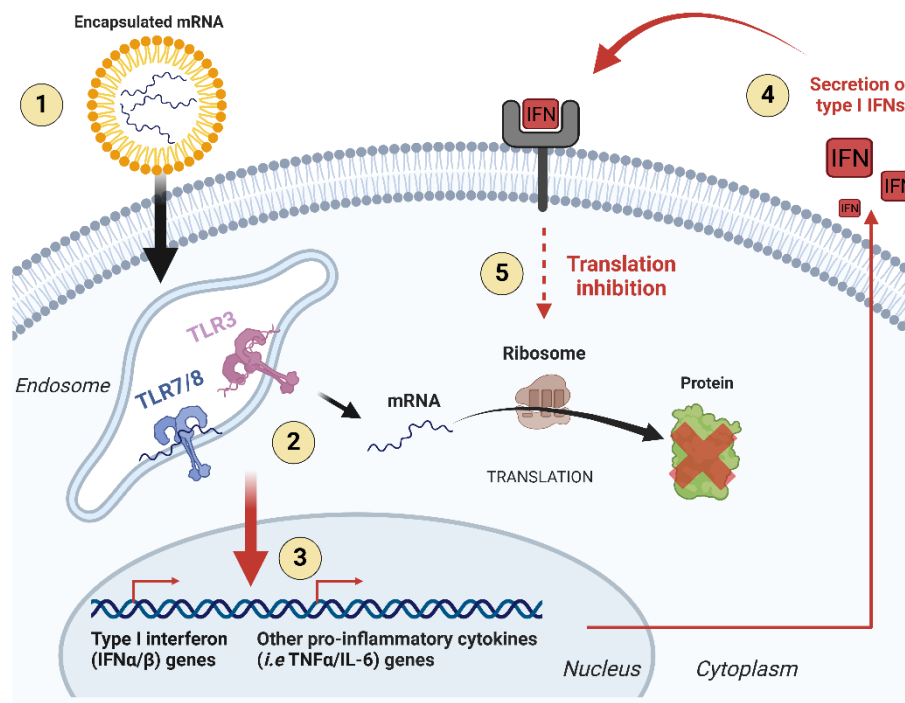


Figure 12 : De la délivrance de l'ARNm à l'activation de l'immunité, réalisé avec Biorender adapté de (Minnaert et al. 2021).

En comparant l'immunogénicité induite par de l'ADN de mammifère ou de bactérie, il a été démontré que l'activation des TLR (toll-like receptors) était liée à des différences de modifications des nucléosides. En effet, (Hemmi et al. 2000) démontrent qu'une absence de méthylation des îlots CpG sur l'ADN bactérien serait responsable de cette activation. L'immunogénicité de l'ARN était-elle aussi régie par ce type de modification ? Cela semblait possible compte tenu des nombreux nucléosides modifiés découverts dans l'ARN.

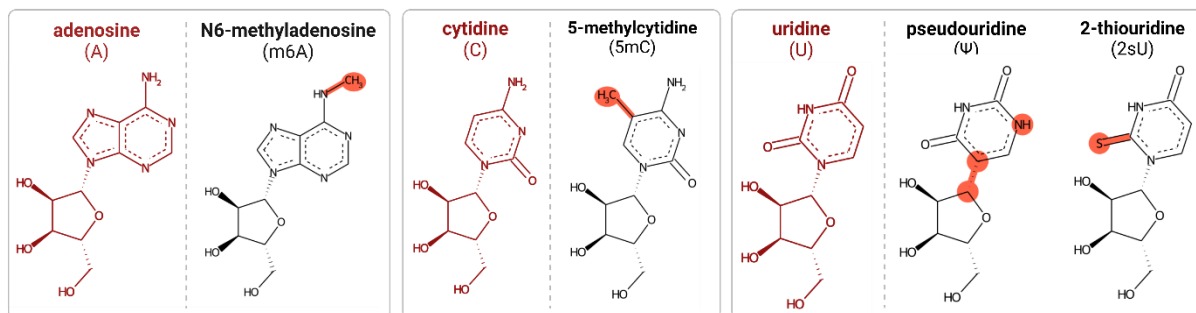


Figure 13 : *Structure chimique des nucléosides modifiés étudiés par Karikó et al. 2005.*

Pour tenter de répondre à cela, les Dr Katalin Karikó et Drew Weissman ont étudié le potentiel immunogène de l'ARN en fonction de l'incorporation de nucléosides modifiés naturels (figure 13). Ils ont démontré que l'utilisation de ces nucléosides modifiés diminue la reconnaissance des ARNm par les senseurs cellulaires de l'immunité innée. Cela a pour effet de drastiquement diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. Ainsi, cela permet d'augmenter l'expression des ARNm modifiés, et d'améliorer leur potentiel thérapeutique, entraînant aussi une réduction des doses à administrer.

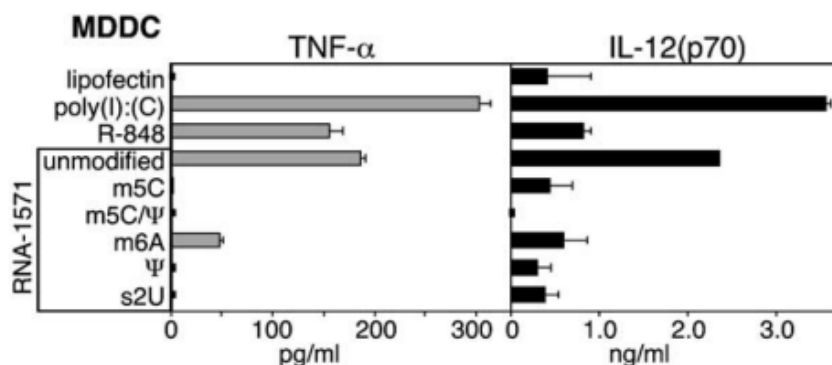


Figure 14: *Production de cytokines par les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) transfectées par différents ARN modifiés, d'après (Karikó et al. 2005).*

Les travaux du Dr Karikó (figure 14) montrent que le vecteur utilisé pour délivrer l'ARNm, la lipofectin, n'induit pas, ou peu, de production de cytokines. En revanche, l'ARNm non modifié (unmodified), à l'instar des contrôles (poly (I):(C) et R-848), induit une production de cytokine systématiquement plus importante que l'ARNm modifié (ex : pseudouridine = Ψ).

Ces travaux ont grandement participé à la recherche sur les nucléotides modifiés. Aujourd'hui, des centaines de modifications endogènes présentent sur les ARNt et ARNm ont été découvertes. De plus, des analogues synthétiques de nucléotides sont désormais produits et largement utilisés à différentes fins (thérapie ou diagnostique) dans le domaine des biotechnologies.

A la suite de ces découvertes, de nombreux vaccins antiviraux à ARNm sont développés et testés *in vivo* contre le virus de la grippe (Petsch et al. 2012), (Pardi et al. 2018), le virus Zika (Pardi et al. 2017) et le virus respiratoire syncytial (RSV) (Geall et al. 2012). Ces travaux prometteurs, s'appuient en partie sur les recherches des lauréats, justifiant l'intérêt de l'utilisation de nucléotides modifiés et l'intérêt croissant de l'ARN comme stratégie pour la vaccination antivirale.

Il est important de noter que d'autres techniques peuvent être employées pour diminuer l'immunogénicité des ARNm, notamment en utilisant des protéines virales (Hale et al. 2008). En effet, certains virus disposent de systèmes qui inhibent la réponse immunitaire innée, ce qui leur permet de détourner la machinerie cellulaire sans déclencher de réponse. C'est le cas de la protéine NS1 (non-structural protein 1) du virus influenza A (Y. Liu et al. 2018). L'équipe du CBM (Centre de Biophysique Moléculaire, à Orléans) a notamment mis en évidence que l'ARNm de la protéine NS1 co-transfecté avec un ARNm d'intérêt, permet d'augmenter son expression (figure 15), (P. Wang et al. 2020).

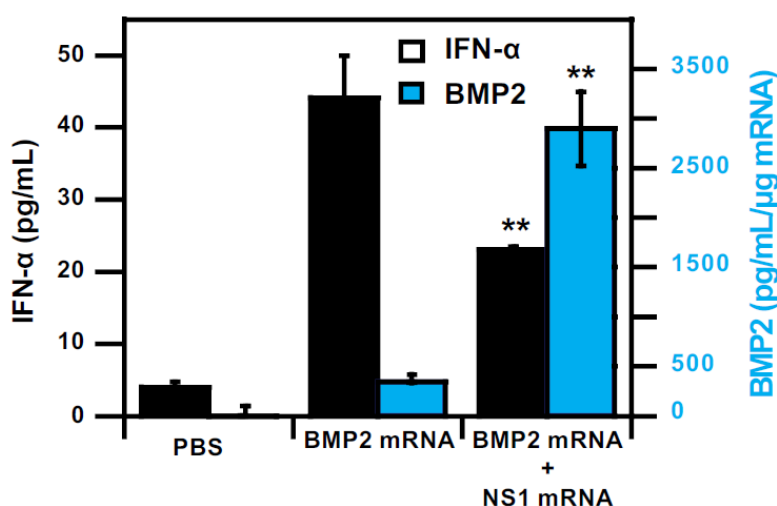


Figure 15 : Co-transfection de cellules ostéoprogénitrices avec l'ARNm BMP-2 et l'ARNm NS1 (P. Wang et al. 2020).

Ces travaux ont montré que si la délivrance de l'ARNm BMP-2 seul induit une production de protéine, elle induit aussi une réaction inflammatoire constatée par une forte expression d'IFN- α . Or, lorsque l'ARNm BMP-2 est co-transfecté avec celui de NS1, on peut observer une diminution significative de l'expression d'IFN- α , et une augmentation d'un facteur 10 de BMP-2 sécrétée.

1.3.7. La purification de l'ARNm

Un ARN non modifié peut, induire une expression supérieure à celle d'un ARNm modifié (m5C/ Ψ) s'il est purifié (Kauffman et al. 2016). En effet, à l'issue de l'IVT, des éléments et des sous-produits indésirables sont présents dans la réaction comme : l'ADN matrice, des nucléotides libres ou l'ARN polymérase. La purification de la réaction est donc importante car une quantité trop importante d'ADN intacte peut pénétrer dans les cellules et s'intégrer de manière incontrôlée dans le génome des patients. De plus, la solution d'ARNm non purifiée peut contenir des ARNm non coiffés, incomplets (tronqués), ou double brins qui peuvent nuire à l'expression de l'ARNm d'intérêt en induisant de fortes réponses inflammatoires indésirables (Karikó et al. 2011). L'élimination de ces impuretés est donc capitale pour améliorer la traduction des ARNm et garantir la sécurité des formulations produites. Par conséquent, des techniques de purification efficaces sont nécessaires (J. Zhang et al. 2023).

Plusieurs techniques de purification sont disponibles comme l'HPLC (high performance liquid chromatography), les colonnes oligo-dT qui peuvent retirer les ARNm tronqués (sans queue polyA), ou la TFF (tangential flow filtration) qui filtre les protéines et les nucléotides libres (Javidanbardan et al. 2025).

1.3.8. Les vaccins à ARNm approuvés

Enfin, pour conclure, la dernière période historique de la recherche sur l'ARNm débute au cours des années 2018 à 2020, lorsque la thérapie basée sur l'ARNm devient une thérapie de rupture en vaccination.

Ces 60 années de progrès continu ont contribué à la mise en œuvre de vaccins antiviraux, conçus pour lutter contre la pandémie du COVID-19, développés à une vitesse sans précédent dans l'histoire du développement des vaccins (J. Zhang et al. 2023). L'approbation des vaccins à ARNm contre le COVID-19 (Comirnaty® et Spikevax®) produits par Pfizer/BioNtech et Moderna a considérablement accéléré le développement des traitements à base de LNP, avec de nombreux essais cliniques en cours (Nele et al. 2024).

Très récemment, en 2024, la FDA et la commission européenne ont approuvé la mise sur le marché du mRESVIA®. Produit par Moderna, ce vaccin à ARNm délivré par des LNP est conçu pour lutter contre le RSV (virus respiratoire syncytial).

En conclusion, ces thérapies ont évolué dans divers contextes. Progressant à l'interface entre chimie et biologie, les chercheurs ont su faire preuve d'ingéniosité pour surmonter les limites de l'utilisation de l'ARNm en thérapie.

Ces avancées, toujours plus importantes, ont contribué à l'essor de cette discipline, qui s'illustre aujourd'hui parmi les thérapies les plus prometteuses.

1.3.9. L'ingénierie de l'ARNm thérapeutique : Les axes d'amélioration et d'optimisation

Nous avons pu voir que certains procédés permettent de surmonter une des limites majeures de l'utilisation de l'ARNm en thérapie : l'immunogénicité.

Dans cette section, nous décrirons les autres leviers disponibles, qui permettent d'outrepasser d'autres limites de l'ARNm en thérapie. En effet, chaque domaine qui compose l'ARNm thérapeutique peut être optimisé :

- **coiffe** : L'utilisation de l'ARCA (anti-reverse cap analog) est très répandue. Cette coiffe (m7G) synthétique contient un groupement méthyle supplémentaire en position 3' afin d'empêcher l'incorporation de la coiffe dans l'orientation inverse (figure 16). Bien que l'ARCA permette de réaliser les fonctions de la cap0, son incorporation dans l'ARNm nouvellement synthétisé n'est pas complète. En effet, 20 à 30% des ARNm produits ne seront

pas coiffés, par conséquent, ils seront plus sensibles aux RNAses et seront faiblement traduits. De plus, ils peuvent déclencher une réponse immunitaire indésirable qui inhibera la traduction.

Dans le but d'optimiser la coiffe des ARNm produits par IVT, la technologie CleanCap® est apparue. Ajoutée de manière co-transcriptionnelle à l'ARNm, cette coiffe dispose d'une structure cap1 optimale, avec un taux de coiffage de plus de 95%.

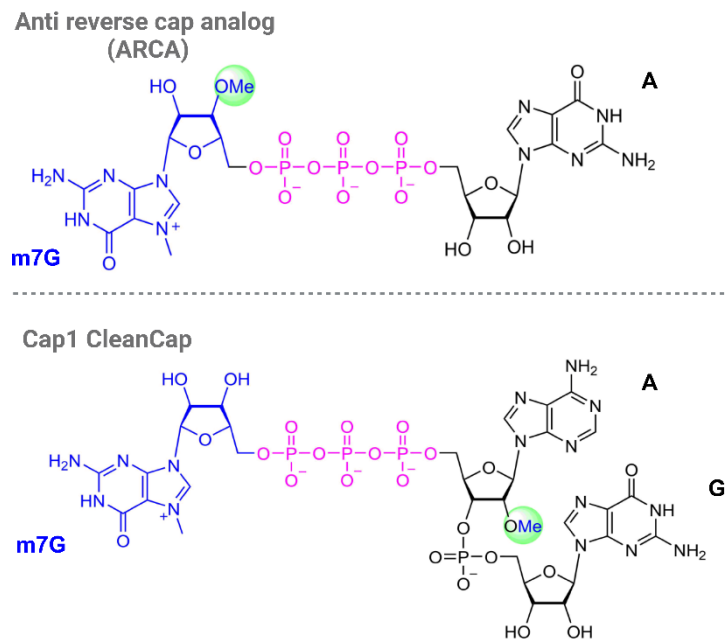


Figure 16 : *Comparaison des structures chimiques de l'ARCA et de la CleanCap (Cap1), adapté de (Shin et al.).*

- **UTR** : En remplaçant les UTRs d'un ARNm instable par des séquences d'un homologue plus stable, on peut prolonger sa demi-vie. Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour obtenir une expression et une stabilité plus élevées. Par exemple, sélectionner des UTR naturels de gènes fortement exprimés (comme l' α - et la β -globine), ou encore, concevoir des UTRs artificiels. Ces modifications minimisent la dégradation de l'ARNm en excluant les sites de liaison aux miR (micro-ARN qui inhibent l'expression des ARNm en les liants) et les régions riches en AU (J. Zhang et al. 2023).

- **ORF** : Sans changer la séquence protéique, en remplaçant simplement les codons rares par des codons plus fréquents, il est possible d'améliorer l'efficacité de la traduction. Ce procédé se nomme « codon optimization ». Cela s'explique car les tRNA abondants dans le cytosol peuvent être réutilisés au cours de la traduction (Cannarozzi et al. 2010).

Des nucléotides chimiquement modifiés (comme la pseudouridine : Ψ) peuvent aussi être utilisés, pour diminuer le risque de déclencher une réponse immunitaire innée importante. (cf paragraphe 1.3.6) .

- **queue polyA** : Une taille optimale est généralement comprise entre 110 et 160 nucléotides. On considère que l'expression la plus forte est atteinte pour une queue de 120 nucléotides (Kormann et al. 2011). Une approche consiste à introduire la queue grâce à une enzyme, cependant on ne peut pas contrôler sa longueur avec précision. En conséquence, une autre méthode peut être employée, qui consiste à construire le plasmide matrice avec la queue directement incluse, ce qui permet d'avoir un meilleur contrôle sur sa taille.

En revanche, dans le cas où la queue mesure plus de 100 nucléotides, il y a un risque de recombinaison au cours de l'amplification du plasmide réalisée par les bactéries (Trepotec et al. 2019). Une alternative intéressante consiste à utiliser une queue segmentée avec des motifs comme le linker UGC (utilisé par BioNTech dans le vaccin contre le COVID-19). Le linker vient scinder la queue en deux parties mesurant chacune une longueur inférieure à 100 nt. Cela permet de réduire le risque de recombinaison, sans nuire à la stabilité du messager.

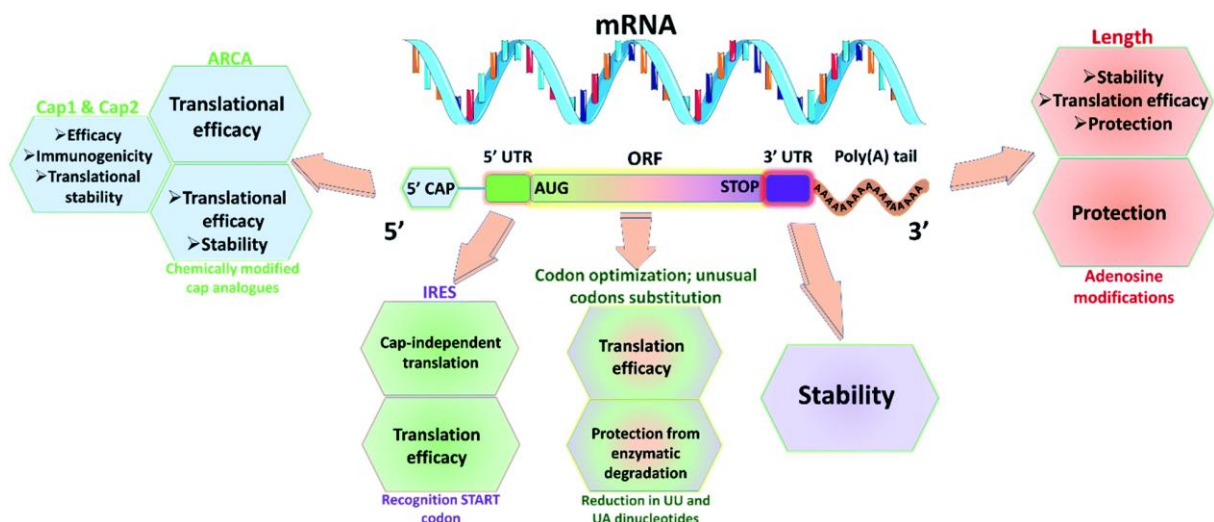


Figure 17 : Illustration des éléments structuraux clés d'un ARNm synthétique et les stratégies d'optimisation possibles pour moduler sa stabilité, son efficacité de traduction et son immunogénicité (Rajendran, Amirthalingam, et Hwang 2022).

CHAPITRE 2 : Vectorisation et délivrance des ARNm

L'ARN messager est négativement chargé et possède un haut poids moléculaire. Par conséquent, il est très faiblement internalisé par les cellules. De plus, il est rapidement dégradé lorsqu'il est délivré seul. Pour ces raisons, le développement de système de délivrance performant a été un facteur clé dans l'évolution des thérapies à base d'ARNm. En effet, en encapsulant l'ARNm, le vecteur le stabilise, le protège et permet sa délivrance au sein des cellules cibles, où il sera traduit.

De nombreux systèmes de délivrance peuvent être employés pour encapsuler et délivrer de l'ARNm. Depuis plusieurs décennies, des vecteurs sont étudiés dans ce but (Niidome et Huang 2002). Les vecteurs non-viraux sont majoritairement utilisés car généralement jugés plus avantageux grâce à leur immunogénicité réduite (Andretto et al. 2023), mais aussi grâce à leur moindre contraintes réglementaires et leur faible coût. Divers types de vecteurs non-viraux ont été développés, souvent cationiques, ils peuvent cependant être neutres ou anioniques (ex : vésicules extracellulaires). Ces vecteurs se distinguent par leur nature chimique. Les plus répandus sont les vecteurs lipidiques, les dérivés de polymères, de peptides, et les nanoparticules inorganiques (Wanting Zhang et al. 2023).

Ces différents vecteurs non-viraux peuvent être utilisés seuls (ex : liposome seul (Ngalle Loth et al. 2025)), ou combinés entre eux (ex : vecteurs lipidiques associés à un polymère (Bugnicourt et Ladavière 2017), vecteur lipidique couplé à des protéines (Brown et al. 2024)).

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord décrire les mécanismes d'internalisation des vecteurs lipidiques en général, ainsi que la libération de leur contenu dans le cytosol des cellules cibles. Nous décrirons ensuite deux vecteurs lipidiques : les nanoparticules lipidiques (LNP) et les liposomes cationiques.

2.1. Internalisation des vecteurs lipidiques par la cellule et mécanismes du trafic intracellulaire

Les études menées sur la délivrance d'ARNm à l'aide de vecteurs lipidiques, convergent pour démontrer qu'au cours de la transfection, les complexes (vecteur/ARNm) vont pénétrer dans les cellules par endocytose (Berger, Lächelt, et Wagner 2024). Au sein des endosomes formés, ces complexes vont naturellement être acheminés vers les lysosomes où ils seront dégradés, ou vers la membrane cellulaire, où ils seront relargués vers l'extérieur (Huotari et Helenius 2011). Pour ces raisons, les complexes doivent s'échapper des endosomes pour libérer l'ARNm dans le cytosol et initier la production de la protéine d'intérêt. Ce processus se nomme « l'échappement endosomal » (endosomal escape), une étape clé dans la délivrance des acides nucléiques formulés à l'aide de vecteurs lipidiques.

2.1.1. Les voies d'endocytoses et le système endosomal

Il existe différentes voies d'endocytose qui varient selon le mécanisme d'invagination de la membrane, mais aussi selon la taille et la nature de la cargaison captée par la cellule.

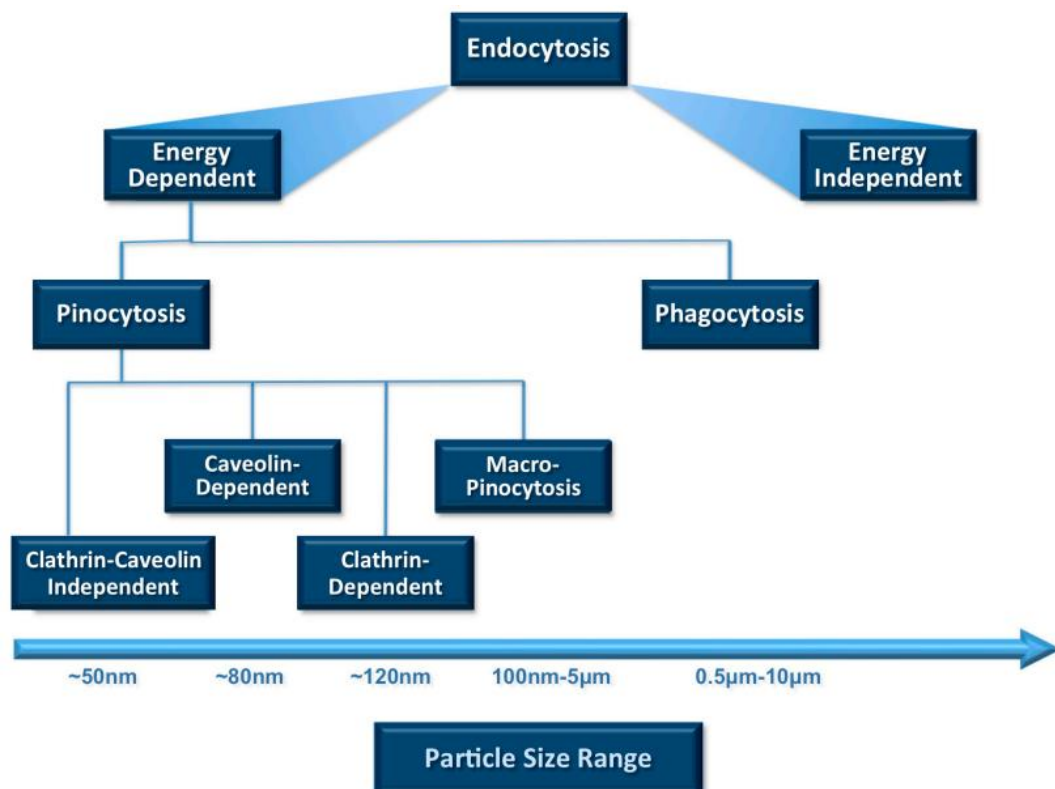


Figure 18 : Taille relative des particules internalisées par différentes voies d'endocytose (Danaei et al. 2018).

La **phagocytose** est un mécanisme d'endocytose qui permet à certaines cellules immunitaires spécialisées (ex : cellules dendritiques) de capter et internaliser un élément pour le détruire ou l'assimiler.

La **pinocytose**, qui est un mécanisme d'endocytose plus répandu parmi les cellules, permet d'absorber des liquides, ou de petites particules qui possèdent une taille inférieure à 100-150 nm.

La **macropinocytose** moins répandue, permet d'internaliser des éléments plus larges, d'un diamètre allant d'une centaine de nanomètres à plusieurs micromètres.

Ces différentes voies d'endocytose induisent une invagination de la membrane qui aboutit à l'obtention de vésicules intracellulaires qui seront prises en charge par le système endosomal (Danaei et al. 2018). Ce système complexe et dynamique composé d'éléments du cytosquelette, de moteurs moléculaires et d'endosomes, permet d'acheminer les éléments internalisés, que l'on nomme cargo, à différents sites d'intérêts. Il est établi que tous les types d'endosomes transitent activement le long de microtubules (Granger et al. 2014). Les endosomes jouent un rôle crucial de tri et de recyclage, influant sur la dégradation des éléments captés et les voies de signalisation.

Il existe différents types d'endosomes (figures 19) que l'on distingue par leur structure, leur composition et leur pH interne. Ces variations de pH sont dues à la présence de pompes à protons dans leurs membranes.

Endosomes précoces : ils reçoivent le matériel internalisé depuis la membrane plasmique en fusionnant avec les vésicules d'endocytose. Ils se caractérisent par un pH légèrement acide (autour de 6,0 à 6,5). Au sein de leurs membranes, on retrouve des protéines spécifiques telles que la GTPase Rab5, et l'effecteur EEA1 (early endosome antigen-1). Les endosomes précoces peuvent diriger le cargo vers le lysosome induisant sa dégradation, ou vers la membrane cellulaire en utilisant une voie de recyclage rapide ou une voie lente qui, elle, nécessite l'utilisation d'endosomes de recyclage (Scott, Vacca, et Gruenberg 2014).

Endosomes tardifs : ils sont le produit de la maturation des endosomes précoces. Cela implique des changements progressifs de leur composition protéique et lipidique, ainsi qu'une acidification croissante (Chatterjee et al. 2024). Situés entre les endosomes précoces et les lysosomes, les endosomes tardifs sont caractérisés par un pH acide d'environ 5,5. Ils contiennent de nombreuses vésicules intraluminales, ce qui leur vaut également le nom de corps multivésiculaires (multivesicular bodies = MVB). Les endosomes tardifs sont enrichis en protéines spécifiques comme Rab7.

Endosomes de recyclage : leur fonction principale est de recycler les composants membranaires internalisés par endocytose vers la surface cellulaire pour être réutilisés. Ce trafic est régulé par diverses protéines, dont Rab11 qui en est un marqueur caractéristique (figure 19).

Lysosomes : ce sont des organites cellulaires présents dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes. Ils se forment par fusion des endosomes tardifs avec d'autres vésicules cellulaires. Le pH des lysosomes est acide (de 4,5 à 5), et ils contiennent une cinquantaine d'enzymes capables de dégrader une grande variété de macromolécules, comprenant les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les polysaccharides (figure 19).

Les exosomes : sont des vésicules extracellulaires d'origine endosomale. Ils contiennent une cargaison spécifique de molécules qui reflète la composition de leur cellule d'origine. Les exosomes sont libérés par presque tous les types cellulaires. Des protéines spécifiques telles que Rab27a leurs sont associés (Gomi et al. 2007).

2.1.2. Les protéines Rab

Les Rab (Ras-related in brain) sont de petites protéines globulaires qui appartiennent à la superfamille des petites GTPases Ras. On les retrouve spécifiquement ancrées dans la membrane des endosomes, ce qui permet de distinguer des endosomes selon les protéines Rab qu'ils contiennent.

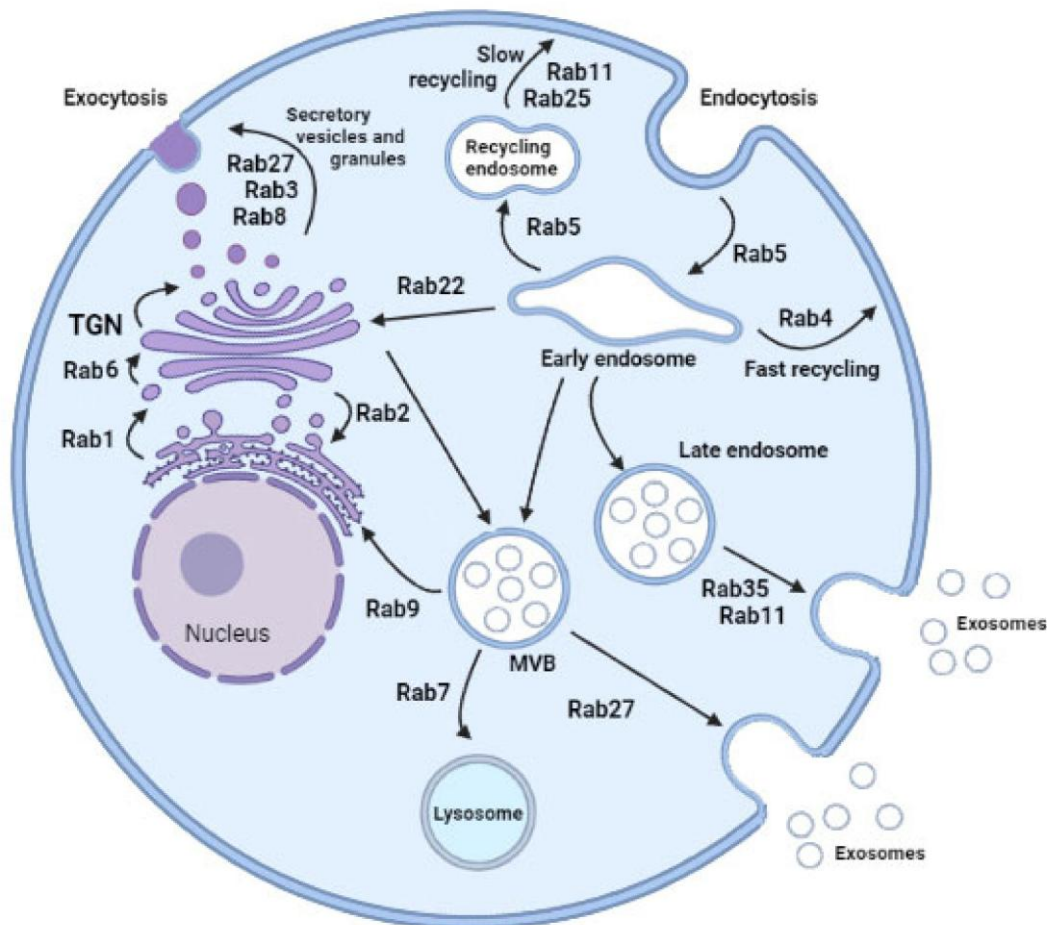


Figure 19 : Trafic intracellulaire de vésicules, médié par les protéines Rab (Martinez-Arroyo et al. 2021).

Les protéines Rab participent à la régulation du trafic vésiculaire intracellulaire (Zerial et McBride 2001). Comme toutes les GTPases, ces enzymes alternent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP, agissant comme un interrupteur moléculaire pour contrôler diverses fonctions endosomales telles que l'endocytose (Rab5), l'exocytose (Rab11, Rab27), la sécrétion de vésicule (Rab27) ou encore les échanges vésiculaires entre organelles (Martinez-Arroyo et al. 2021). Les protéines Rab peuvent aussi recruter des effecteurs, pour diverses fonctions comme la maturation des endosomes (Rab7).

L'utilisation de protéines Rab sous forme de protéine chimères permet de visualiser spécifiquement les endosomes d'intérêt. Afin d'étudier les protéines Rab chez la drosophile, Dunst et al. ont fusionné l'YFP (yellow fluorescent protein) à différentes Rab d'intérêt dans le but de déterminer leur expression et leur localisation subcellulaire dans divers tissus et types cellulaires (Dunst et al. 2015). En suivant cette méthodologie, il est possible de suivre la dynamique du trafic vésiculaire en microscopie à fluorescence en présence des vecteurs lipidiques.

2.1.3. L'échappement endosomal, un enjeu crucial des thérapies à base d'ARNm

L'étude des mécanismes de l'échappement endosomal vise à optimiser la délivrance de l'ARNm au sein du cytosol. Plusieurs études démontrent que la majorité des vecteurs internalisés dans les cellules sont soit : dégradées dans les lysosomes, adressées à la membrane, ou restent bloquées dans les endosomes (Paramasivam et al. 2021). En somme, une quantité très limitée du cargo est libérée dans le cytosol (Chatterjee et al. 2024). Une étude menée sur des LNP-siRNA a montré que seulement 1 à 2% des siRNA endocytés s'échappaient des endosomes (Gilleron et al. 2013).

Pour cette raison, l'amélioration de l'échappement endosomal représente un enjeu majeur des thérapies à base d'ARN, car l'optimisation de ce dernier pourrait décupler l'efficacité des formulations. Actuellement, bien que de nombreuses études aient été menées, il n'y a pas de consensus sur la localisation subcellulaire ni sur le timing exact de l'échappement endosomal (Maugeri et al. 2019). Toutefois, les études suggèrent majoritairement que l'échappement endosomal aurait lieu dans les étapes précoces du trafic intracellulaire (Johansson et al. 2024).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'échappement endosomal :

- Un premier mécanisme suggère une interaction électrostatique entre les lipides des vecteurs et ceux des endosomes. Ces interactions induisent la formation de structures hexagonales (H_{II}) menant à la déstabilisation de la membrane de l'endosome (figure 20).

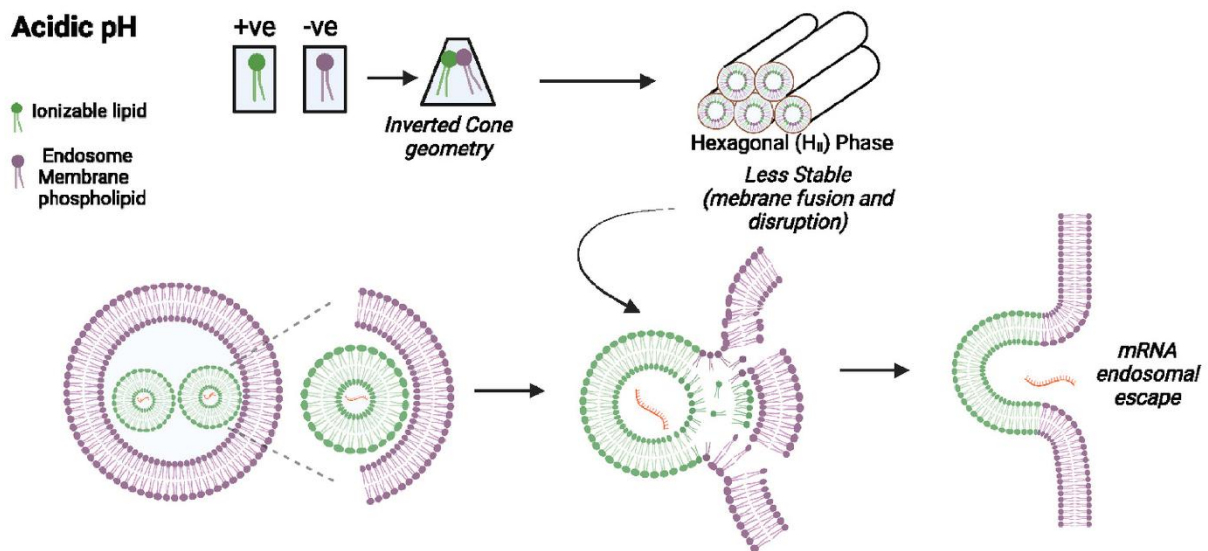


Figure 20 : Illustration de la transition de phase de LNP dans l'endosome induisant la libération du cargo, adapté de (Chatterjee et al. 2024).

En milieu acide, certains lipides, dit ionisables, se protonent ce qui leur permet d'interagir avec les lipides chargés négativement de la membrane des endosomes selon un mécanisme de flip-flop proposé par Xu *et al.* (Xu et Szoka 1996). Ces interactions déstabilisent la membrane de l'endosome, permettant le relargage du cargo (Y. Zhang et al. 2021).

- Le second mécanisme est l'effet « éponge à proton ». Pour maintenir un pH acide nécessaire au bon fonctionnement du système endosomal, les endosomes possèdent des pompes à protons (V-ATPases). Lorsqu'un lipide ionisable se protone à l'intérieur de l'endosome, il exprime une charge qui sera neutralisée par l'entrée d'anion dans l'endosome par transport passif. En conséquence, l'endosome gonfle jusqu'à éclater, induisant la libération du cargo dans le cytosol.

2.2. L'évolution des systèmes de délivrance lipidiques pour l'ARNm

Les lipides sont des molécules organiques hydrophobes ou amphiphiles. Les lipides amphiphiles (ex : phospholipides) sont caractérisés par la coexistence d'une partie polaire et d'une partie hydrophobe apolaire (figure 21) (Israelachvili, Mitchell, et Ninham 1977). Outre le fait qu'ils soient biodégradables et biocompatibles, ils peuvent s'autoassembler sous une multitude de structures différentes dans un environnement aqueux. Par conséquent, les lipides sont fortement étudiés pour la délivrance de molécules thérapeutiques (Shah et al. 2020).

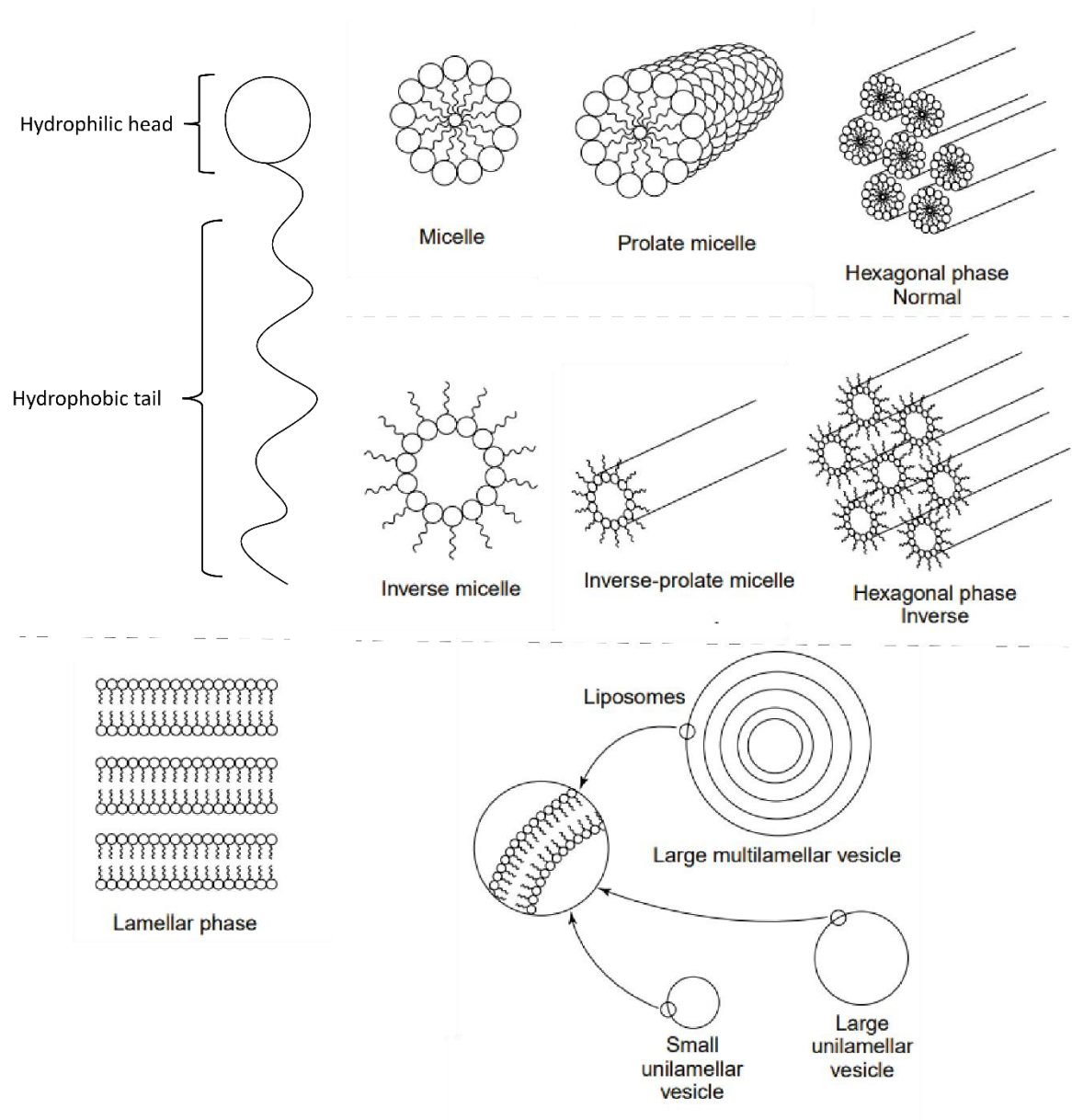


Figure 21 : Autoassemblage des lipides amphiphiles adapté de (Lasic 1998).

Dans le cadre des thérapies basées sur l'ARNm, l'obtention de systèmes de délivrance lipidiques modernes et performants est l'aboutissement de dizaines d'années de recherche. Certaines des avancées les plus marquantes dans le développement des vecteurs lipidiques sont illustrées ci-dessous.

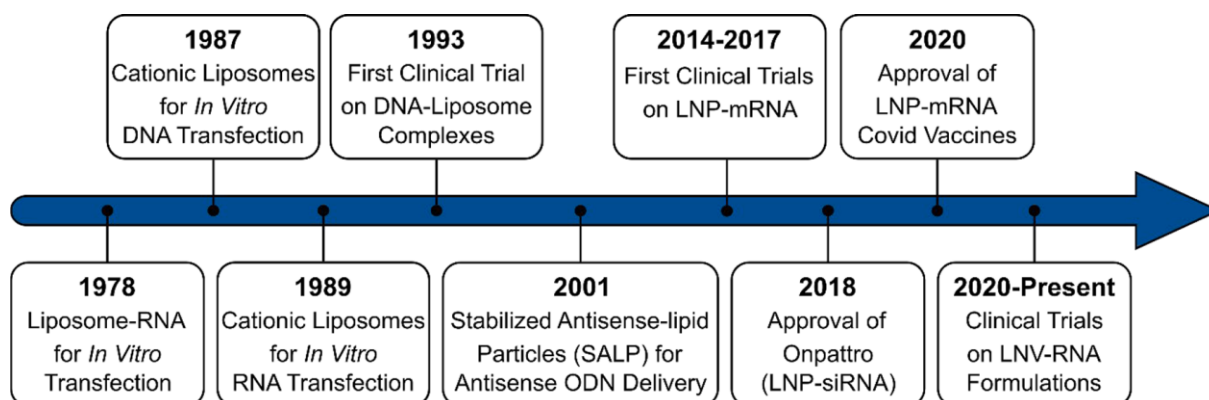


Figure 22 : Chronologie des principaux développements dans la formulation de l'ARN, de (Nele et al. 2024)

2.2.1. Les liposomes cationiques

Un liposome est une particule composée de lipides qui s'agencent entre eux pour former une vésicule sphérique. A la différence des micelles constituées d'une simple couche lipidique, les liposomes sont constitués d'une bicouche lipidique, et peuvent être uni-lamellaires ou multi-lamellaires (figure 21).

En 1978, pour la première fois, de l'ARNm est délivré dans une cellule *in vitro* par un liposome et permet la production d'une protéine d'intérêt (Ostro et al. 1978; Dimitriadis 1978). En 1989, un liposome cationique, initialement conçu pour délivrer de l'ADN (Felgner et al. 1987) est utilisé pour délivrer de l'ARNm *in vitro* (Malone, Felgner, et Verma 1989). Le liposome est composé d'un lipide cationique, le DOTMA (N-(1-(2,3-dioleoyloxy) propyl)-N,N,N-triméthylammonium) (figure 24), et d'un lipide neutre, le phosphatidyléthanolamine (PtdEtn). Ils ont démontré que le DOTMA neutralise les charges négatives de l'ADN, aboutissant à la formation de complexes cationiques. Ces lipoplexes (liposome + acide nucléique) interagissent avec la surface chargée négativement de la cellule permettant la délivrance intracellulaire de l'ADN (Mislick et Baldeschwieler 1996).

En fonction de la nature des lipides utilisés dans les liposomes cationiques, différentes organisations de lipoplexes ont été décrites. La structure lamellaire, ou en feuillets (L_α), la structure hexagonale « directe » (H_I) et la structure hexagonale inversée (H_{II}). L'acide nucléique, représenté ici en bleu, peut alors être complexé différemment, suivant les structures adoptées.

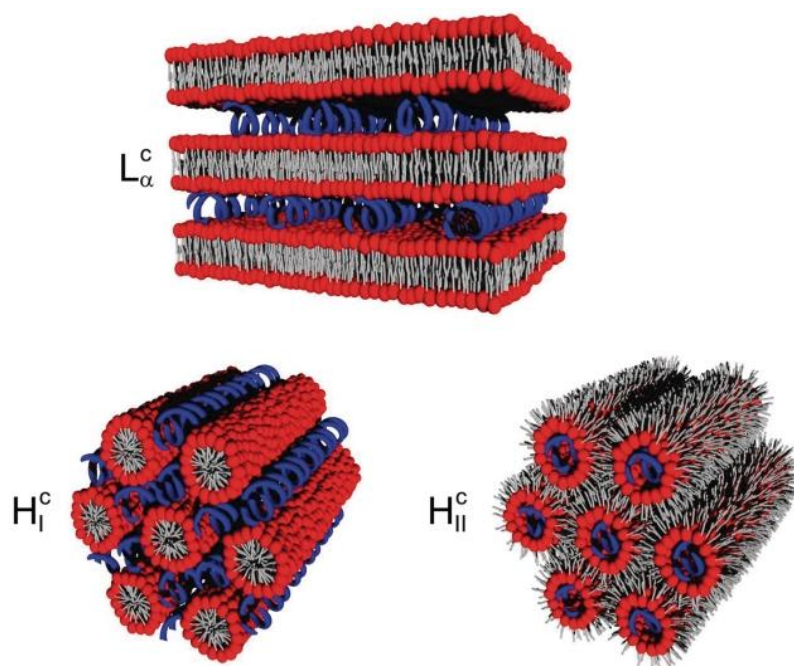


Figure 23 : Représentation de structures lamellaire (L_α), hexagonale (H_I) et hexagonale inversée (H_{II}) de lipoplexes (Allain, Bourgaux, et Couvreur 2012).

Dans l'étude de Felgner et ses collaborateurs (1987), il est intéressant de mentionner que les liposomes composés uniquement de DOTMA étaient presque aussi efficaces que les liposomes DOTMA/PtdEtn, tandis que les liposomes formulés avec le PtdEtn et un lipide anionique, substitué au DOTMA, n'étaient pas fonctionnels. Cela démontre l'importance d'une charge cationique pour la délivrance des acides nucléiques.

En 1989, une étude réalisée par les mêmes auteurs se porte sur la délivrance d'ARNm avec un liposome cationique composé de DOTMA et de DOPE (1,2-diélaïdoyl phosphatidyl éthanolamine), un phospholipide. Les quantités de protéines produites avec cette nouvelle formulation étaient 5 à 100 fois supérieures à celles obtenues avec les techniques de transfection classiques (ex : DEAE-dextran ou la poly-lysine) avec l'ADN, et 100 à 1000 fois supérieures avec l'ARNm (Malone, Felgner, et Verma 1989).

Par la suite, des formulations ont été commercialisées, c'est le cas de la Lipofectin® composée de DOTMA et DOPE (Malone, Felgner, et Verma 1989) qui est toujours disponible aujourd'hui. Le tableau suivant récapitule l'évolution de ces formulations au cours du temps.

Tableau 1 : Evolution des dérivés de la Lipofectin® pour la délivrance d'acide nucléique.

Date	Produit	Composition	Acide nucléique
1987-89	Lipofectin®	DOTMA/DOPE	ADN, ARN
1995	Lipofectamine®	DOSPA/DOPE	ADN, ARN
2000-01	Lipofectamine® 2000	Lipides cationiques	ADN, ARN, co-transfection de siRNA
2010-11	Lipofectamine® RNAiMAX	Lipides cationiques optimisés	siRNA, miRNA
2014-15	Lipofectamine® 3000	Lipides cationiques +/- réactif P3000™	ADN, ARN, co-transfection de siRNA
2015-16	Lipofectamine® MessengerMAX	Lipides optimisés pour l'ARNm	ARNm
2016-17	Lipofectamine® Stem	Formulation optimisée pour les cellules souches	ADN, ARN

Parmi ces réactifs de transfection lipidiques commercialisés par ThermoFisher SCIENTIFIC, on note la Lipofectamine MessengerMAX™ qui est fortement utilisée pour la délivrance de l'ARNm.

2.2.2. Des lipides cationiques aux lipides ionisables

La structure des lipides cationiques, devenu des éléments clés de la délivrance des acides nucléiques, contient généralement trois parties : une tête polaire, un linker et une queue hydrophobe (figure 25).

La tête polaire des lipides cationiques exprime une charge positive. Elle permet d'établir des interactions électrostatiques avec les charges négatives des phosphates présentes sur l'ARN, induisant la formation de complexes.

Le linker sert de jonction entre la tête hydrophile et la queue hydrophobe. Idéalement le linker doit être suffisamment stable pour le stockage, mais aussi pour subsister dans un environnement biologique. Cependant, il doit aussi être biodégradable pour faciliter la libération du cargo au site d'intérêt (Y. Zhang et al. 2021).

Dans le but de réduire la toxicité du DOTMA, une série de lipides cationiques ont été synthétisés et étudiés. C'est le cas du DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane), qui dispose d'une meilleure biocompatibilité grâce à une modification du linker. En effet, les éthers du DOTMA ont été substitués par des esters biodégradables (figure 24) (Leventis et Silvius 1990).

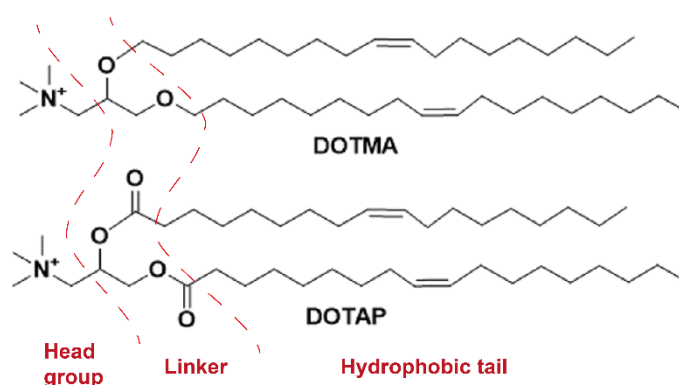


Figure 24 : Structures chimiques du DOTMA et du DOTAP, adapté de (Sun et Lu 2023).

La queue hydrophobe a un impact sur la structure des complexes et permet d'interagir avec les membranes physiologiques (Zhou et al. 2017). Elle peut affecter la lipophilie (ou l'hydrophobie) des lipides, leur température de transition ou l'efficacité de transfection. En effet, sa longueur et son degré d'insaturation permet de moduler la fluidité des membranes (Tros de Ilarduya, Sun, et Düzgüneş 2010) en influant sur la température de transition des lipides (Y. Zhang et al. 2021).

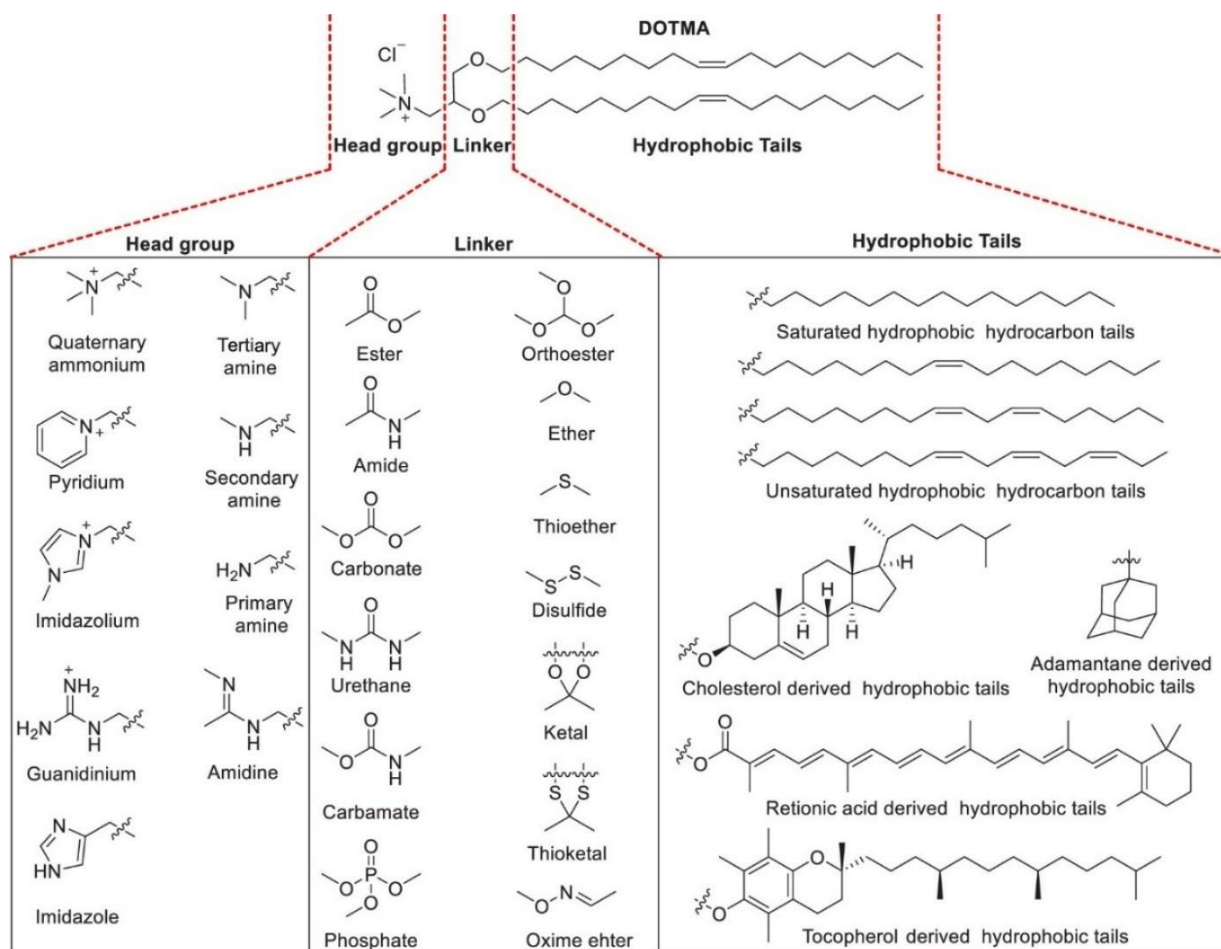


Figure 25 : Structure chimique du DOTMA, et illustration de la composition de lipides synthétiques cationiques, de (Y. Zhang et al. 2021)

Des bibliothèques de lipides cationiques ont été développées en modulant chacune des parties (tête, linker et queue) des lipides cationiques (figure 25 et figure 27) pour déterminer l'impact de ces structures sur les performances des particules formées (Ren et al. 2000) (Massing et al. 2000). Ces travaux ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de transfection, mais aussi d'optimiser les lipides en termes de biocompatibilité et d'efficacité de transfection. Dans ce contexte, des lipides composés de têtes polaires dérivées de l'imidazole ont été synthétisés. C'est le cas du KLN25 (tête imidazolium) et du MM27 (tête imidazole), deux lipides utilisés pour nos travaux, qui seront détaillés par la suite.

Ainsi, l'intégration de lipides cationiques de première génération dans les liposomes ont permis de complexer et délivrer plus efficacement les acides nucléiques que les méthodes préexistantes (Malone, Felgner, et Verma 1989). Les liposomes formés par les lipides cationiques et les lipides auxiliaires (lipides généralement neutres ex : DOPE) étaient relativement stables. Il a été démontré que la charge positive facilite l'internalisation des lipoplexes par les cellules, mais aussi la déstabilisation des membranes des endosomes, facilitant le relargage du cargo (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014).

Malgré une bonne efficacité de transfection, la charge cationique permanente portée par ces lipoplexes entraînait une cytotoxicité considérable *in vitro*. De plus, *in vivo*, la taille importante des complexes associée à leur charge aboutissait à une clairance rapide, une certaine toxicité, et une activation du système immunitaire liés à l'adsorption de protéines sériques (liée à la charge), diminuant leur efficacité (Lv et al. 2006).

En somme, l'utilisation des lipides cationiques pour la délivrance d'acide nucléique se limitait globalement à la délivrance *in vitro*. Les caractéristiques inhérentes aux lipides cationiques de première génération semblaient peu compatibles avec la délivrance *in vivo*. L'amélioration successive des formulations (lipides cationiques, lipides auxiliaires, méthodes de production) a permis de surmonter ces obstacles.

Dans ce contexte, Semple et ses collaborateurs ont proposé un nouveau processus de formulation, substituant le lipide cationique à un lipide « ionisable » pour complexer un acide nucléique (Semple et al. 2001). A l'instar du DOTMA, ces lipides comme le DODMA (1,2-dioleoyloxy-3-diméthylamino-propane) ou le DODAP (1,2-dioleoyloxy-3-(diméthylamino) propane) utilisés dans l'étude de Semple et ses collaborateurs, sont composés d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe reliées par un linker (figure 26).

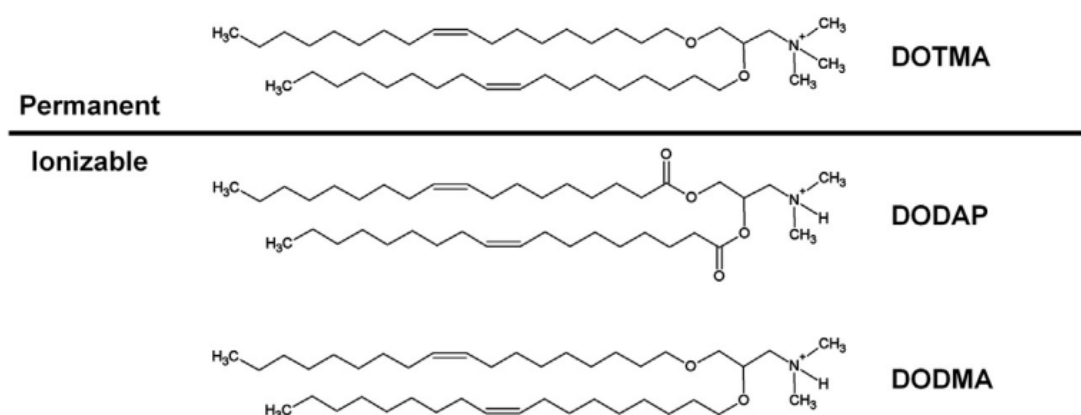


Figure 26 : Lipides cationiques et lipides ionisables, adapté de (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014).

Cependant, à l'inverse du DOTMA, les lipides ionisables ne possèdent pas de charge cationique permanente. Leur tête polaire possède un pKa inférieur à 7, présentant une charge positive à pH acide en se protonant, mais restant neutre à pH physiologique.

Par conséquent, cela permet aux lipides ionisables de complexer efficacement les acides nucléiques à pH acide, via des interactions électrostatiques. En revanche, à pH physiologique, les complexes formés possèdent une charge globale faible, ce qui permet de surmonter en partie les limites exposées précédemment quant à l'utilisation des lipides cationiques permanents. Cela a permis la formulation de vecteurs neutres chargés d'acide nucléique augmentant significativement la demi-vie des particules délivrées par voie intraveineuse (Semple et al. 2001). Cette méthode de formulation ingénieuse permet d'obtenir une bonne efficacité d'encapsulation en conservant les avantages liés à l'utilisation des lipides cationiques, tout en limitant leurs effets indésirables.

Ces particules nommées « SALP » (stabilized antisense-lipid particles) décrites par Semple et ses collaborateurs sont les précurseurs d'un nouveau type de vecteur lipidique : les LNP.

A la différence des liposomes cationiques qui sont formulés et ensuite complexés avec l'acide nucléique pour former des lipoplexes, les LNP sont formulés à pH acide en mélangeant des lipides avec l'acide nucléique d'intérêt.

2.2.3. Les nanoparticules lipidiques (LNP)

Aujourd'hui, les recherches sur la synthèse de lipides ionisables et cationiques innovants pour la délivrance d'acide nucléique sont toujours dynamiques. En 2018, le médicament Onpattro®, constitué de LNP chargés de siRNA injectés par voie intraveineuse, est autorisé par la FDA pour le traitement de l'amylose à transthyrétine héréditaire (hATTR), une maladie génétique rare liée à la production de transthyrétine (TTR) défectueuse dans le foie. Les recherches pré-cliniques qui ont mené à l'autorisation de Onpattro® résultent d'optimisations constantes de la composition des lipides ionisables. Ces optimisations ont été validées in vivo, en mesurant le silencing du facteur VII (FVII), une protéine hépatique, après administration de LNP-siRNA par voie intraveineuse. Des travaux initialement réalisés avec le DLin-DMA (figure 27), ont montré des résultats encourageants sur des primates non-humains (Zimmermann et al. 2006). Cependant, les systèmes n'étaient pas assez optimisés pour permettre un développement clinique.

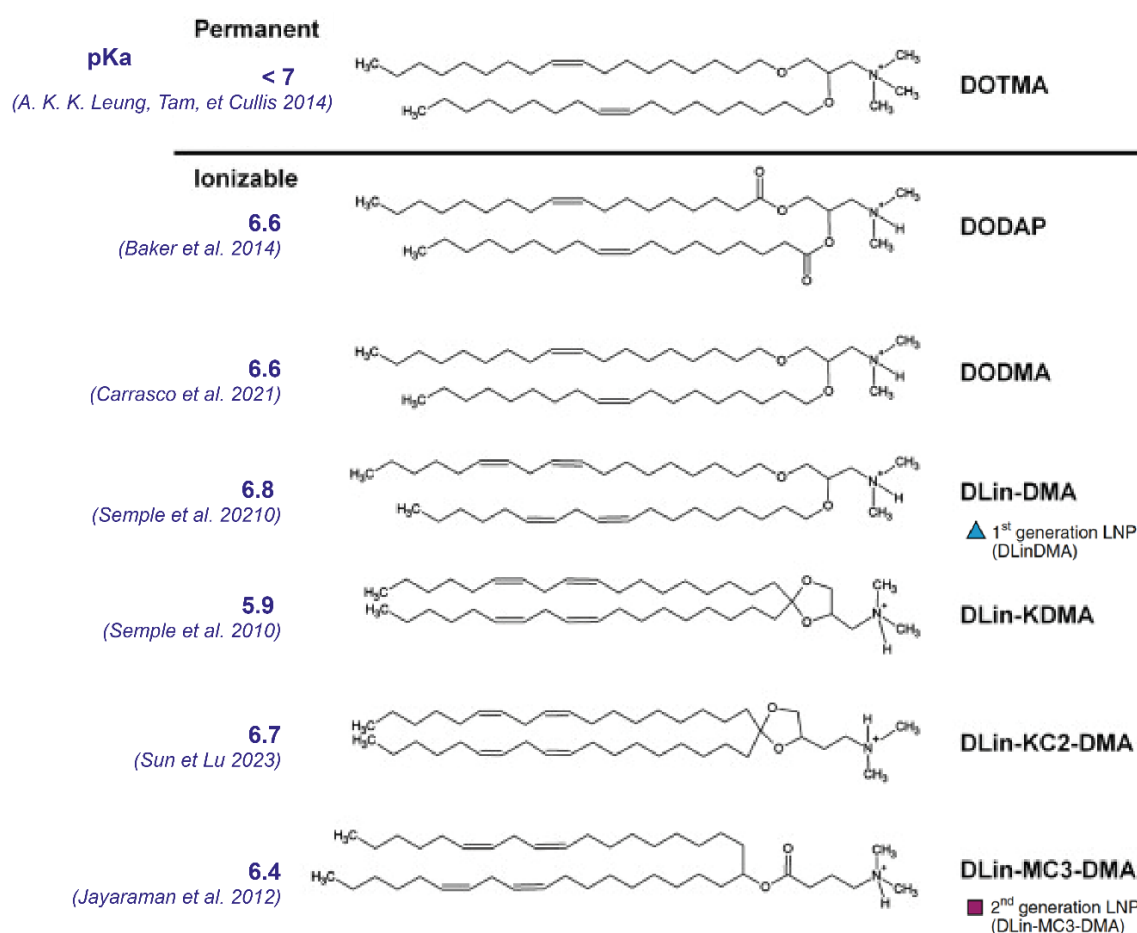


Figure 27 : Evolution de la structure des lipides ionisables, de (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014). L'efficacité des lipides DLin-DMA et DLin-MC3-DMA a été comparée in vivo (voir figure 28).

Les recherches se sont intensifiées en se focalisant sur la composition des lipides ionisables (Akinc et al. 2019). Cela a mené à la synthèse du DLin-KC2-DMA (Semple et al. 2010) puis du DLin-MC3-DMA (Jayaraman et al. 2012), que l'on nomme usuellement « KC2 » et « MC3 » (figure 27). Les études ont démontré que le pKa des lipides ionisables est un élément important dans leurs performances in vivo, avec un pKa optimal se situant entre 6,2 et 6,5. Ainsi, une différence de pKa de 0,5 peut diminuer les performances des vecteurs d'un facteur 100 (Jayaraman et al. 2012). L'ensemble de ces données ont servi de référence pour le design de formulations thérapeutiques toujours plus performantes.

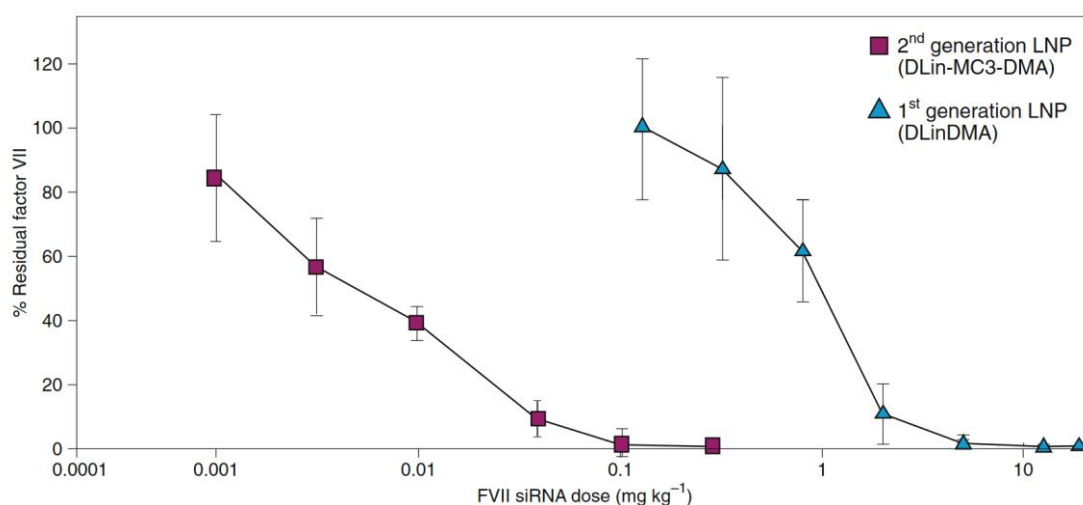


Figure 28 : Amélioration des performances du DLin-MC3-DMA par rapport au DLin-DMA pour diminuer le FVII in vivo, tiré de (Akinc et al. 2019).

Ces travaux ont ouvert la voie au développement clinique de nombreuses thérapies géniques, notamment la délivrance de l'ARNm (Akinc et al. 2019). A l'instar des liposomes cationiques pour l'ADN, ces LNP initialement développés pour la délivrance de siRNA ont par la suite été employés pour la délivrance de l'ARNm.

Actuellement, les LNP sont les systèmes de délivrance d'ARN les plus avancés (Hamilton, Swingle, et Mitchell 2023; Chatterjee et al. 2024). Le développement rapide des vaccins à ARNm approuvés pour lutter contre le virus responsable de la pandémie du COVID-19 (Baden et al. 2021; Polack et al. 2020) ont prouvé leur potentiel.

Les LNP pour la délivrance de l'ARNm

Outre les lipides ionisables impliqués dans la complexation de l'ARNm et l'efficacité de transfection, les LNP contiennent des lipides PEGylés, des phospholipides 'helper' et des stérois.

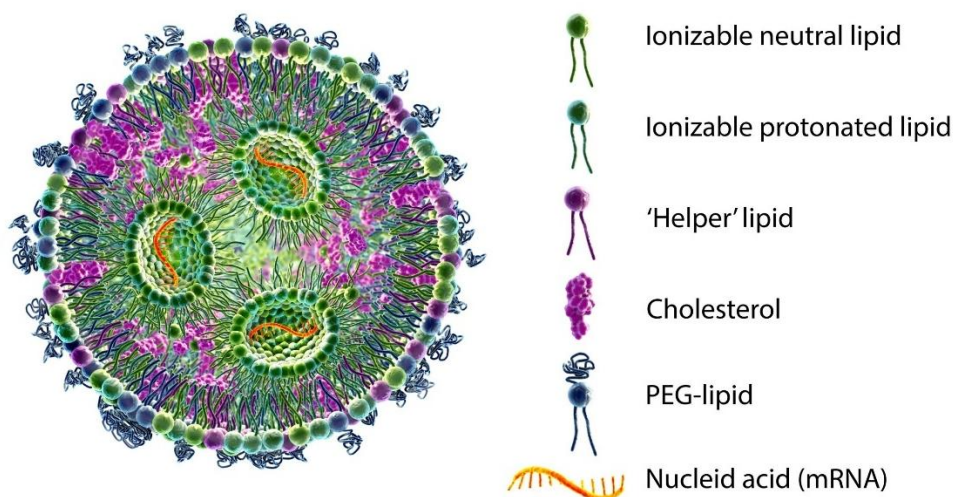


Figure 29 : *Composition de LNP pour la délivrance d'ARNm, de (« Get the Right Lipid Nanoparticle Formulation for Stability » 2024).*

Chaque composant possède un rôle spécifique, que nous allons détailler dans les sections suivantes.

Les lipides PEGylés

Les lipides PEGylés (conjugué au polyéthylène glycol) permettent de limiter l'agrégation des LNP en créant une barrière stérique hydrophile à leur surface (figure 29). En limitant les interactions non spécifiques, ils permettent de réduire l'activation du système immunitaire et aussi d'augmenter la durée de circulation des formulations in vivo. Sans lipides PEGylés, des nanoparticules lipidiques possédant une faible charge formeraient instantanément des agrégats (A. K. K. Leung, Tam, et Cullis 2014).

Cependant, ces avantages s'accompagnent d'inconvénients comme le développement de réaction immunogène et la diminution des interactions des LNP avec les membranes cellulaires, limitant donc l'efficacité de transfection et l'échappement endosomal.

Cet équilibre « avantages/inconvénients » posé par la PEGylation est qualifié de « PEG dilemma » (Yu et al. 2023).

En somme, malgré certaines limites, les lipides PEGylés améliorent la stabilité et la biocompatibilité des nanoparticules lipidiques.

Les phospholipides helpers

Les phospholipides helpers (ou auxiliaires) n'agissent pas directement sur la complexation de l'ARNm, cependant, ils influent sur la morphologie de la particule, sa stabilité, sa taille, sa rigidité ainsi que sur le trafic intracellulaire et l'échappement endosomal.

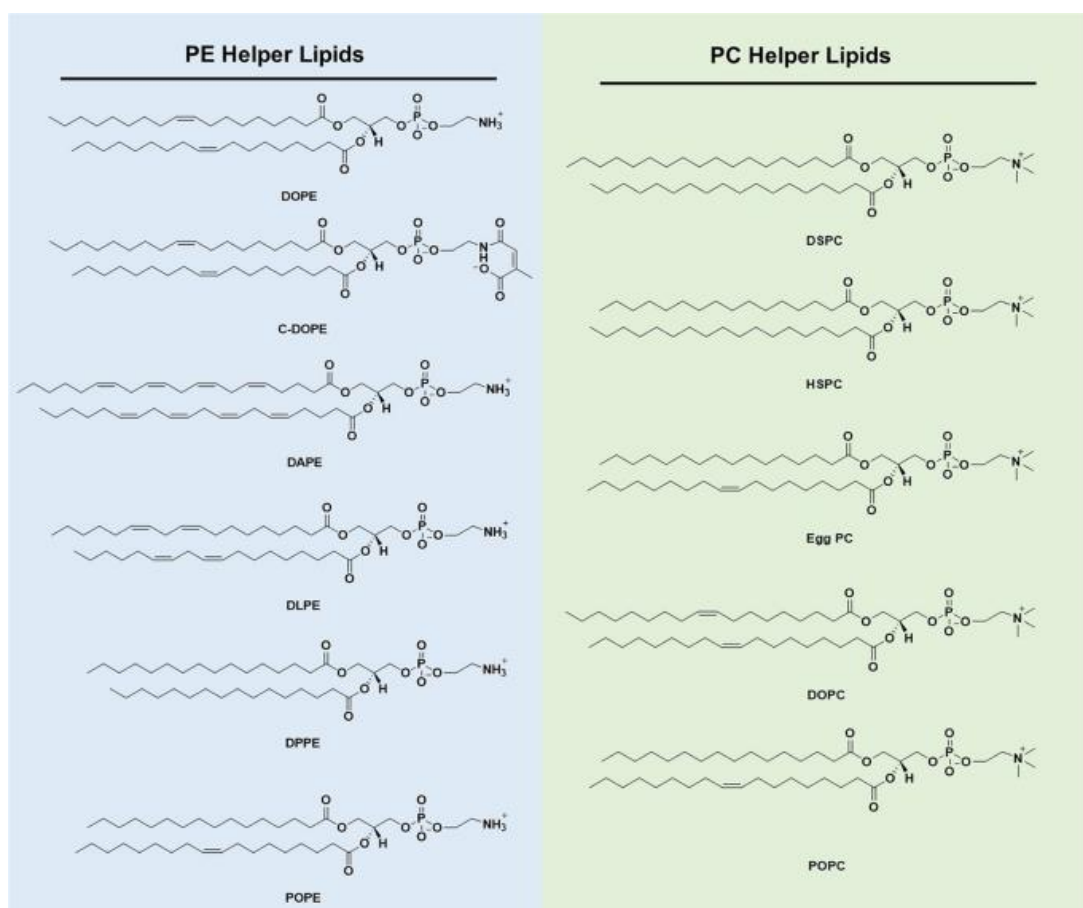


Figure 30 : Structure de phospholipides helpers couramment utilisés pour la formulation de nanoparticules lipidiques, phosphatidyléthanoline (PE), phosphatidylcholine (PC), adapté de (Sun et Lu 2023)

Le caractère amphiphile des phospholipides leur permet de s'auto-assembler sous une multitude de structures différentes dans un environnement aqueux (Israelachvili, Mitchell, et Ninham 1977). Ces structures sont adoptées en fonction de plusieurs paramètres, notamment la géométrie des lipides.

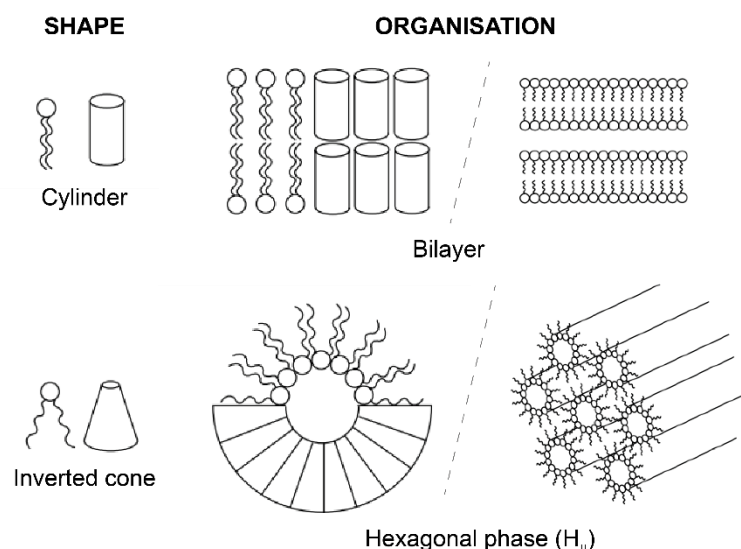


Figure 31 : *Effet de la géométrie des lipides sur leurs organisations, adapté de (Shah et al. 2020).*

En effet, les phospholipides qui possèdent une géométrie cylindrique (ex : DSPC (1,2-distearin sn-3-phosphorylcholine)), s'agencent en bicouche (phase lamellaire) ou en grande vésicule en fonction de l'environnement. Tandis que les lipides qui possèdent une géométrie en cône inversé (ex : DOPE) induisent la formation de structures micellaires inversées (figure 31) (Lasic 1998).

La composition en phospholipide helper affecte donc la structure des nanoparticules, mais aussi leur stabilité et leur efficacité à délivrer l'ARNm (Barbieri et al. 2024). En effet, dans le cas du DOPE, sa géométrie favorise la formation de structures hexagonales inversées qui déstabilise les membranes des endosomes, facilitant l'échappement endosomal (Y. Zhang et al. 2021). Dans le cas du DSPC, sa géométrie favorise la formation de phase lamellaire qui stabilisent la structure des nanoparticules. Pour ces raisons, il a notamment été employé dans la formulation des vaccins approuvés contre le COVID-19 (Hou et al. 2021).

Toutefois, des études démontrent de meilleures efficacités induites par les LNP à base de DOPE par rapport aux LNP à base de DSPC in vivo (Kowalski et al. 2019), (R. Zhang et al. 2021) au détriment d'une moindre stabilité (Álvarez-Benedicto et al. 2022).

En somme, les morphologies des phospholipides helpers impactent la physico-chimie des nanoparticules en modulant leur efficacité de transfection, morphologie et stabilité.

Le cholestérol

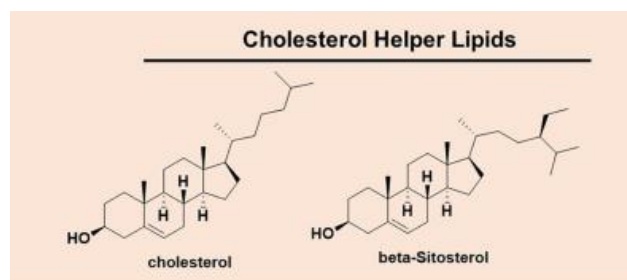


Figure 32 : Formules chimique du cholestérol et β -sitostérol, adapté de (Sun et Lu 2023).

Le cholestérol, qui est une molécule rigide, permet d'augmenter la stabilité des nanoparticules en modulant la rigidité des membranes. L'incorporation de cholestérol permet aussi d'améliorer la biocompatibilité des LNP (Nele et al. 2024) et facilite la fusion des membranes (R. Zhang et al. 2021). Pour ces raisons, le cholestérol est largement utilisé dans la formulation de LNP et est notamment présent dans la composition de l'ensemble des formulations des vaccins actuellement autorisés.

Dans le but d'optimiser les formulations, des analogues du cholestérol sont étudiés. Il a été démontré que l'incorporation de phytostérol à la place du cholestérol module les propriétés structurales et l'efficacité de transfection des nanoparticules (Eygeris et al. 2020). Plusieurs études démontrent notamment un effet bénéfique du β -sitostérol (figure 32) sur les performances (figure 33).

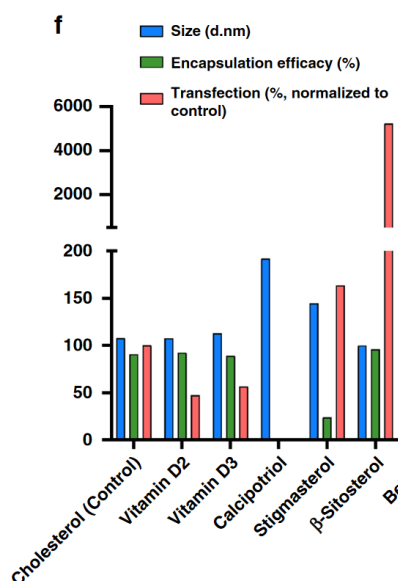


Figure 33 : Criblage d'analogue du cholestérol pour l'amélioration de la délivrance d'ARNm adapté de (Patel et al. 2020).

En effet, en évaluant l'efficacité de transfection de 9 analogues du cholestérol, Patel et ses collaborateurs ont observé que le β -sitostérol a été le plus efficace, sur 8 types cellulaires testés (Patel et al. 2020). De plus, ces résultats ont démontré que le β -sitostérol permet de booster la transfection indépendamment du lipide ionisable ou de l'acide nucléique délivré. Enfin, les LNP à base de β -sitostérol possèdent une taille et une efficacité d'encapsulation similaire à celle des LNP à base de cholestérol.

En conclusion, les LNP sont des systèmes de délivrance aboutis et performants, fruit de décennies d'innovations. Les phospholipides helpers et les analogues de cholestérol représentent des axes d'amélioration intéressants et sont fortement étudiés dans le but d'améliorer la stabilité, l'efficacité de transfection ou la biocompatibilité des nanoparticules. Dans ce contexte, nous étudierons la formulation de LNP à base de DOPE, DSPC et β -sitostérol pour la délivrance d'ARNm in cellulo et in vivo dans le chapitre 4.

2.3. Les techniques de formulation et d'analyse des vecteurs lipidiques

2.3.1. Les techniques de formulation des vecteurs lipidiques

Dans la section suivante, nous allons nous intéresser aux techniques de formulation des vecteurs lipidiques pour la délivrance d'ARNm. Indépendamment de la technique de formulation, le choix des paramètres tels que le pH, les tampons, la concentration en lipides ou la vitesse de mélange, jouent un rôle important en modulant les propriétés des nanoparticules formées.

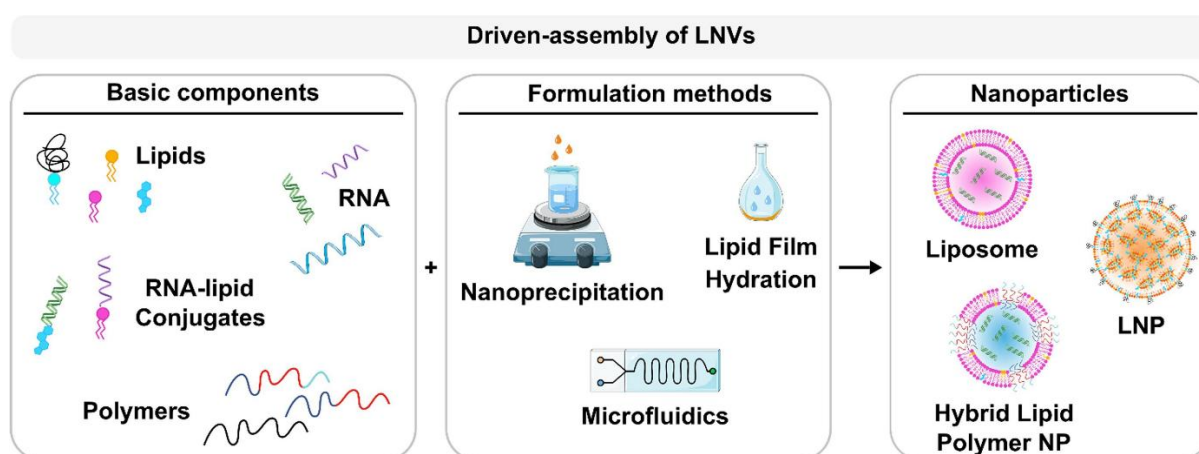


Figure 34 : Stratégies de formulations de vecteurs à base de lipides (Nele et al. 2024).

L'hydratation de film lipidique : c'est l'une des premières techniques utilisées pour la synthèse de particules lipidiques. Elle consiste en l'hydratation d'un film lipidique à l'aide d'un tampon aqueux, ce qui permet la formation de vésicules multi-lamellaires (Nele et al. 2019).

La nanopréciipitation : cette technique consiste au mélange d'une phase aqueuse à une phase organique hydrophile contenant les lipides. Le solvant organique est ensuite éliminé par dialyse ou ultracentrifugation (H.-W. Liu et al. 2021).

Ces deux techniques peuvent produire des particules de tailles variables et donc limiter la reproductibilité des formulations. Par conséquent, les particules obtenues peuvent être soumises à des traitements supplémentaires pour améliorer leur qualité et obtenir des tailles précises, ou une uniformité de taille. Dans ce cadre, la sonication ou l'extrusion à travers une membrane avec des pores de tailles définies sont employés (A. W. Y. Leung et al. 2019). L'extrusion est recommandée car elle permet un contrôle plus précis des tailles (Nele et al. 2024). Aussi, afin d'améliorer la reproductibilité et le contrôle des formulations, de nombreuses approches ont été mises en place, notamment la microfluidique.

La microfluidique : consiste au mélange des composants dans de fins canaux, tout en contrôlant les débits. L'ensemble des formulations de LNP approuvées pour la délivrance d'ARNm sont conçues par microfluidique. En plus de la précision, cette technique permet l'utilisation de très petits volumes, mais est toutefois facilement adaptable à grande échelle.

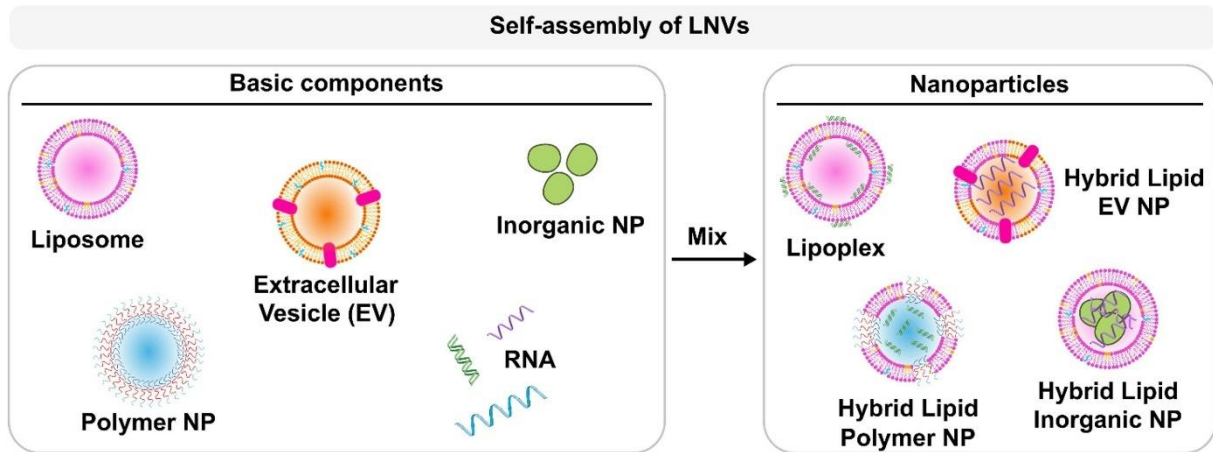


Figure 35 : *Stratégies de formulation de nanoparticules chargées d'ARN à base de lipides*
(Nele et al. 2024).

L'auto-assemblage : il consiste au simple mélange des réactifs qui s'agencent en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, notamment leurs charges et leurs hydrophobicité généralement dans un milieu aqueux (ex : liposome + ARNm = lipoplexe).

2.3.2. Les techniques d'analyse des vecteurs lipidiques

De nombreux tests peuvent être employés pour caractériser et contrôler la qualité des nanoparticules. Ces résultats permettent d'établir des relations structure-activité.

Les principaux tests permettant d'évaluer les vecteurs et les complexes (ARNm-vecteurs) sont listés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : *Techniques d'analyses et de contrôle qualité de l'ARNm, et des nanoparticules qui encapsulent l'ARNm, adapté de (Schoenmaker et al. 2021)*

Echantillon	Objectif de l'évaluation	Tests
Vecteur, Vecteur-ARNm	Taille des particules et distribution des tailles	DLS*, NTA*, MALS*, CryoTEM*
	Potentiel zeta	ELS*
	Morphologie des nanoparticules	CryoTEM, SAXS, ESEM*, AFM*
Vecteur-ARNm	Efficacité d'encapsulation	Quantification par colorants fluorescents, HPLC
	Evaluer la complexation de l'ARNm	EMSA*
	Quantifier l'intégrité de l'ARNm, des lipides	HPLC, Spectrométrie de masse
	Evaluer les performances et la toxicité	Evaluation de la protéine codé par l'ARNm, test de toxicité

* **HPLC** : high performance liquid chromatography – **DLS** : dynamic light scattering – **NTA** : nanoparticle tracking analysis – **MALS** : multi-angle light scattering – **ELS** : electrophoretic light scattering – **cryoTEM** : cryogenic transmission electron microscopy – **SAXS** : small angle X-ray scattering – **AFM** : atomic force microscopy – **ESEM** : environmental scanning electron microscopy – **EMSA** : Electrophoretic mobility shift assay

Reproductibilité et contrôle qualité

La reproductibilité des formulations est un paramètre essentiel, car des changements structuraux entraînent des variations d'interactions entre les particules et l'ARNm. Cela a pour effet de modifier les interactions avec les cellules, et en conséquence modifier les performances et la stabilité des complexes (Nele et al. 2024). De ce fait, il est aussi important d'analyser les propriétés physico-chimiques des vecteurs, et des complexes dans le but de s'assurer que les formulations produites respectent les critères de qualité.

La taille par exemple est un élément relativement simple à mesurer qui a pourtant une importance majeure. En effet, en fonction de la taille des complexes, les voies d'internalisation par endocytose varient.

De plus, la distribution des tailles au sein d'un échantillon est aussi importante à évaluer, car une distribution homogène est souvent associée à une haute qualité. La granulométrie ou index de polydispersité (PDI), à l'instar de la taille, peut être associée au contrôle qualité. Plus le PDI sera faible, plus le batch produit sera considéré de qualité. En effet, un $PDI \leq 0.2$ correspond à une population de particule considérée homogène, avec peu de variation de tailles. Plus le PDI sera élevé et éloigné de cette valeur, plus la population sera considérée hétérogène en termes de taille.

Afin d'étudier les techniques d'analyses des vecteurs lipidiques, nous allons nous intéresser aux travaux de Carrasco et ses collaborateurs, qui ont analysés 5 LNP à base de lipides ionisables différents (voir figure 27), en utilisant de multiples techniques (figure 36, 37, 38).

DLS : Dynamic light scattering

La taille et le PDI peuvent être mesurés par la technique de « Dynamic Light Scattering » communément appelée DLS (voir figure 36 ci-dessous).

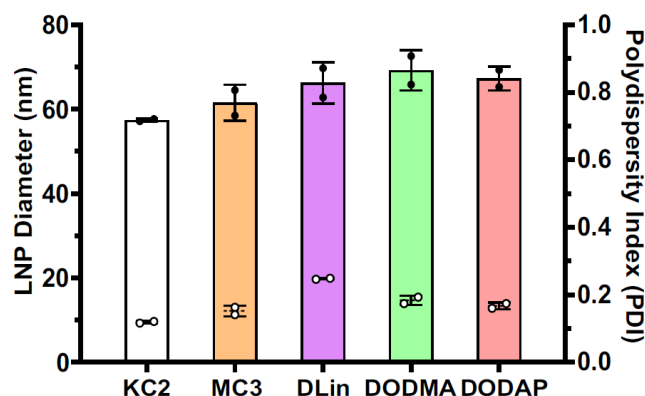


Figure 36 : Taille et PDI de 5 LNP, mesuré par DLS, de (Carrasco et al. 2021)

Cette technique spectroscopique permet de déterminer la taille (diamètre hydrodynamique) des particules grâce à leurs mouvements browniens, évalués grâce à la diffusion de la lumière. Les particules de faible taille diffusent la lumière rapidement, et les particules plus imposantes, plus lentement.

La DLS permet donc de calculer le coefficient de diffusion « D », puis par un jeu de calcul, de déterminer le diamètre hydrodynamique « d_H », selon l'équation de Stokes-Einstein.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Avec

d_H : Diamètre hydrodynamique η : Viscosité du solvant

k : Constante de Boltzmann D : Coefficient de diffusion

T : Température

La DLS est une technique couramment utilisée pour caractériser les nanoparticules lipidiques chargées d'ARNm ou les vecteurs vides.

CryoTEM

De l'anglais « transmission electron microscopy » (TEM), la microscopie électronique à transmission est une technique de microscopie qui permet de générer l'image d'un échantillon à l'aide d'un faisceau d'électrons. La TEM propose une meilleure résolution que la microscopie optique classique qui utilise la lumière visible. En effet, cela est lié à la longueur d'onde des faisceaux utilisés, de plusieurs centaines de nanomètre pour la microscopie optique contre quelques picomètres pour la TEM.

La cryomicroscopie électronique à transmission (cryoTEM) est une technique de microscopie dérivée de la TEM. Basée sur le même principe, elle diffère de la TEM par la méthode de préparation de l'échantillon. En effet, en TEM, les échantillons sont généralement déshydratés, et des agents de contrastes tels que l'acétate d'uranyle peuvent être ajoutés, ce qui peut générer des artefacts ou altérer l'échantillon. En cryoTEM, l'échantillon est hydraté et rapidement congelé dans le but de préserver sa structure native (Lévy et al. 2021). Cela permet de visualiser des éléments tels qu'ils existent en solution, sans forcément utiliser d'agents de contraste (Stewart 2017).

Dans le cadre de l'analyse de vecteurs et de complexes lipidiques, la cryoTEM permet d'analyser les structures des nanoparticules, avec une haute résolution, et cela à plusieurs échelles, de quelques nanomètres, à plusieurs micromètres.

En ce qui concerne les lipoplexes, cette technique a permis de visualiser leur structure lamellaire. En analysant les images de cryoTEM, les chercheurs ont démontré que l'acide nucléique est piégé au sein des lamelles (Gustafsson et al. 1995). Par la suite, cette technique a contribué à la conception de modèles, proposant les étapes de formation des complexes vecteur/acide nucléiques (Weisman et al. 2004). Aujourd'hui, la cryoTEM est principalement utilisée pour évaluer la taille et la distribution de taille, mais aussi la morphologie des particules, les volumes internes, ainsi que l'épaisseur et le nombre de couches lipidiques (Clogston 2022). Le but est d'affiner au mieux la caractérisation des vecteurs et des complexes. Par exemple, la cryoTEM permet d'identifier les différentes organisations adoptées par les complexes, telles que les phases lamellaires ou hexagonales, observées pour deux formulations distinctes ci-après (figure 37).

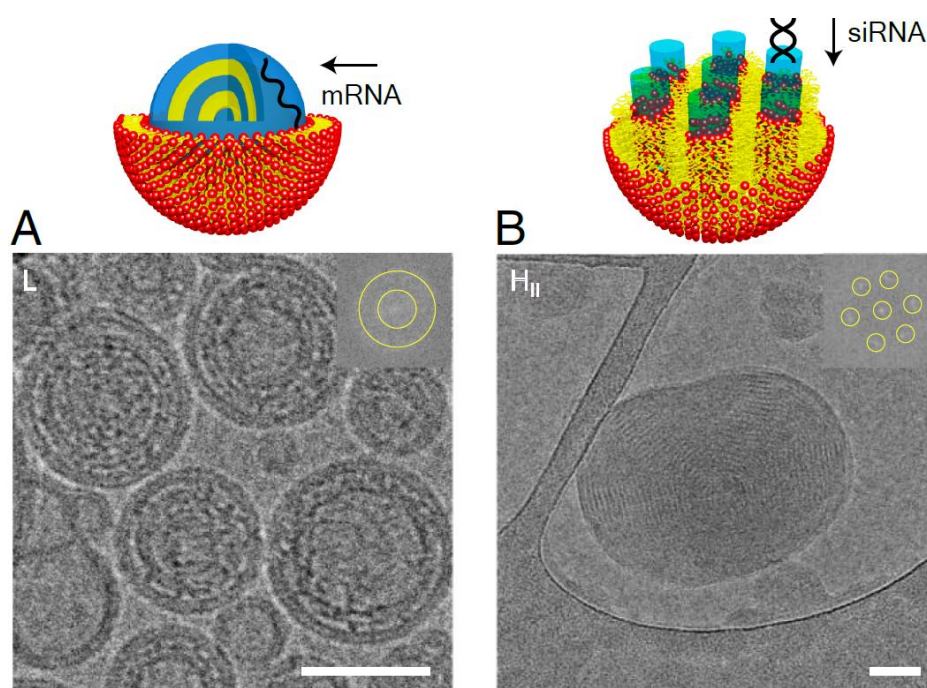


Figure 37 : (A) Images de cryoTEM de complexes vecteurs/ARNm en phase lamellaire et (B) de complexes vecteur/siRNA en phase hexagonale, adapté de (Zheng et al. 2023). Barre d'échelle = 50nm.

La cryoTEM peut être couplée à d'autres techniques d'analyse (figure 38). Sur cette figure, Carrasco et al. comparent l'organisation interne de cinq LNP composés de cinq lipides ionisables différents. Ils observent que les LNP formulés avec les lipides ionisables qui possèdent une queue di-linoléiques (KC2, MC3 et DLin) ont une forme sphérique avec une

structure interne relativement homogène (a, b, c figure 38). Cependant, les LNP formulés avec les lipides qui possèdent une queue di-oléiques (DODMA et le DODAP) ont une forme hétérogène (d, e, f, g figure 38). Pour compléter leur étude, ils ont réalisé une analyse SAXS.

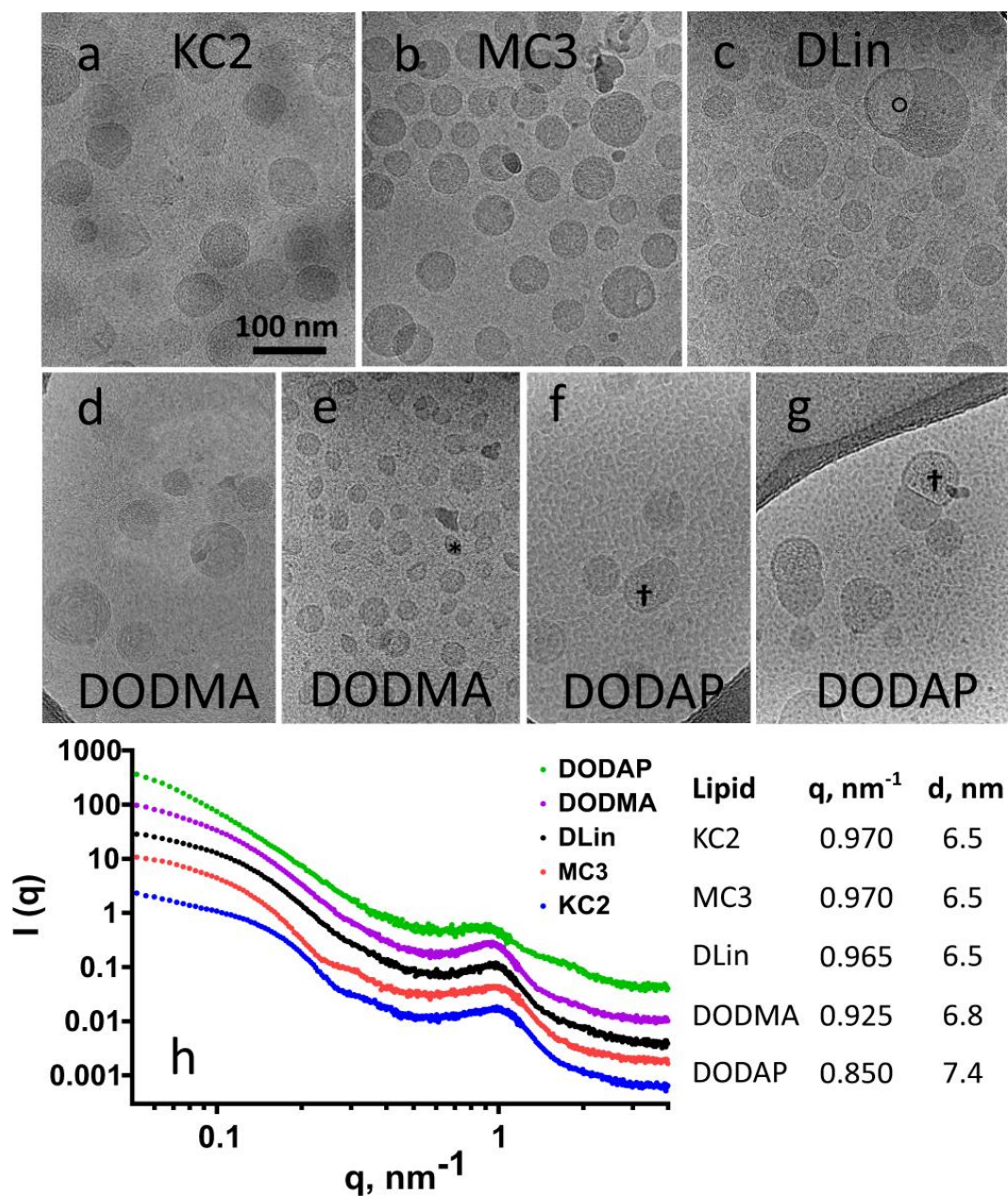


Figure 38 : Caractérisation de différents LNP par CryoTEM et SAXS, de (Carrasco et al. 2021)

SAXS

De l'anglais « small angle X-ray scattering » (diffusion de rayons X aux petits angles), cette technique permet d'obtenir des informations structurales sur un échantillon.

Les rayons X incidents sont diffusés par les électrons de l'échantillon. Les ondes diffusées sont mesurées et détectées en fonction de l'ordre et du désordre atomique présent dans l'échantillon. On peut en déduire des informations sur la périodicité et l'organisation des structures nanométriques de l'échantillon (Malvern Panalytical «SAXS», le 17/11/2024).

Le SAXS est utilisé pour analyser la structure de vecteurs lipidiques complexés avec l'ARNm. La technique est souvent associée à d'autres techniques comme la DLS ou la CryoTEM.

Dans l'étude menée par Carrasco et al, le SAXS permet de mesurer précisément la distance entre les chaînes du squelette phosphate de l'ARNm encapsulé au sein des LNP. Cette distance est aux alentours de 6.5 nm pour tous les LNP, sauf les LNP à base de DODAP avec une distance de 7.4 nm. En corrélant cette observation avec les analyses cryoTEM, ils déduisent que cette distance serait liée à la présence d'eau dans les LNP à base de DODAP (†, images f et g figure 38).

En conclusion, de nombreuses techniques d'analyses sont employées pour caractériser les paramètres physico-chimiques, la biocompatibilité et les performances des vecteurs lipidiques. Cela permet de définir des critères de qualité précis, et de valider si les formulations produites répondent à ces critères ou non. De plus, ces analyses permettent aussi d'enrichir nos connaissances quant aux différentes interactions existantes entre les lipides, le cargo et le milieu, permettant ainsi d'affiner les modèles et hypothèses préexistantes.

CHAPITRE 3 : L'ARNm en médecine régénérative,

application au tissu osseux

3.1. La médecine régénérative

La médecine régénérative vise à restaurer ou à remplacer des tissus ou des organes endommagés pour rétablir leurs fonctions normales. Cela peut être réalisé via plusieurs méthodes comme : la transplantation d'organe, la construction de tissus artificiels en utilisant la nanomédecine, la bio-impression 3D ou l'ingénierie tissulaire (Altyar et al. 2023).

L'ingénierie tissulaire, une branche de la médecine régénérative, utilise des biomatériaux servant d'échafaudages ou de structures pour soutenir la croissance du tissu lésé via l'association de cellules progénitrices ou de facteurs inducteurs. Ces biomatériaux d'origine naturelle ou synthétique miment souvent la matrice extracellulaire. Initialement, les premiers dispositifs étaient constitués de matériaux biocompatibles qui servaient à combler le défaut ou agissaient comme des pansements (Ledo et al. 2020). Les biomatériaux de nouvelle génération peuvent être fonctionnalisés ou combinés à des éléments bioactifs comme des cellules, des protéines recombinantes ou des acides nucléiques.

Dans le but d'améliorer les dispositifs thérapeutiques, plusieurs stratégies sont employées.

La thérapie cellulaire, qui repose sur la délivrance de cellules progénitrices telles que les cellules souches mésenchymateuses qui peuvent se différencier en cellules d'intérêt, participant activement à la régénération du tissu lésé.

La thérapie par facteurs de croissance ou la thérapie génique, qui reposent sur la délivrance de protéines recombinantes ou d'acides nucléiques pour induire une signalisation au niveau du site lésé, favorisant sa réparation.

Par conséquent, bien que l'on distingue ces différentes stratégies, les frontières entre elles sont souvent floues, car elles peuvent être combinées pour façonner de nouveaux dispositifs thérapeutiques plus efficaces.

Dans les sections suivantes, nous allons aborder deux stratégies qui permettent d'améliorer le potentiel thérapeutique des biomatériaux utilisés en médecine régénérative : la thérapie cellulaire et la thérapie génique.

3.1.1. La thérapie cellulaire

Dans le cadre de la médecine régénérative, la thérapie cellulaire vise à délivrer des cellules progénitrices pour permettre la réparation du tissu endommagé.

Les cellules souches

Les cellules souches sont largement utilisées dans le domaine de la médecine régénérative. Une cellule souche est une cellule capable d'auto-renouvellement et de différenciation.

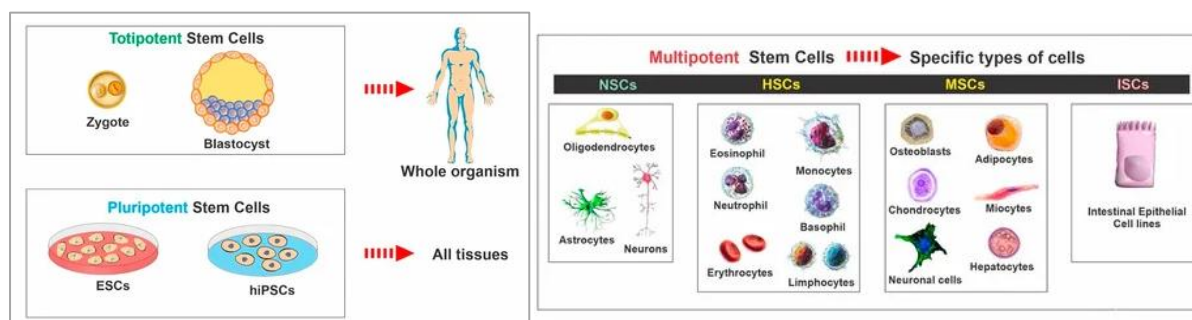


Figure 39 : Classification des cellules souches (ESCs: embryonic stem cells, hiPSC: human induced pluripotent stem cells, NSC: neural stem cells, HSC: hematopoietic stem cells, MSC: mesenchymal stem cells), adapté de (Sivandzade et Cucullo 2021).

On peut distinguer les cellules souches embryonnaires des cellules souches présentes chez l'adulte. Parmi les cellules souches embryonnaires, on retrouve des cellules souches totipotentes et pluripotentes, qui peuvent générer tous les types cellulaires de l'organisme. A la différence des cellules pluripotentes, les cellules totipotentes peuvent produire les annexes embryonnaires, ces structures temporaires qui se forment au cours du développement de l'embryon mais qui ne feront pas partie du futur organisme. Enfin, chez l'adulte, on retrouve des cellules multipotentes et unipotentes, ayant respectivement la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires appartenant à une même lignée ou un seul type cellulaire (Sivandzade et Cucullo 2021).

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les cellules souches mésenchymateuses (mesenchymal stem cells, MSC), également nommées cellules stromales mésenchymateuses sont des cellules multipotentes, qui ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Prockop 1997), jouant donc un rôle important dans la réparation des tissus. Bien qu'elles aient été identifiées dans presque tous les tissus conjonctifs, les MSC ont été majoritairement étudiées et caractérisées après avoir été isolées de la moelle osseuse (Uccelli, Moretta, et Pistoia 2008; Fu et al. 2019).

Les iPSC (induced pluripotent stem cells)

Ces cellules souches sont générées artificiellement à l'état indifférencié (reprogrammation) à partir de cellules somatiques adultes, grâce à l'introduction de plusieurs gènes (comme Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) (Takahashi et Yamanaka 2006). Les chercheurs John B. Gurdon et Shinya Yamanaka ont obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2012 pour cette découverte.

Ces cellules pluripotentes peuvent se différencier en une grande diversité de types cellulaires, plus large que les MSCs. Par ailleurs, contrairement aux cellules souches embryonnaires, les cellules iPS ne nécessitent pas l'utilisation d'embryons humains, ce qui évite les controverses éthiques ; aussi, elles peuvent être générées à partir des propres cellules d'un patient permettant une médecine personnalisée, ou bien de générer des modèles cellulaires pathologiques. De ce fait, leurs capacités sont étudiées en médecine régénérative pour de nombreuses applications : diabète, maladies neuro-dégénératives, fractures osseuses, régénération du cartilage, du foie, et autres tissus (Wei et al. 2024).

Toutefois, bien qu'elles soient polyvalentes, les thérapies cellulaires possèdent plusieurs limites. Notamment, des limites liées à des défis biologiques, comme les risques de rejets en cas d'utilisation de cellules allogéniques ou de formation de tumeurs. De plus, des défis éthiques persistent en ce qui concerne l'utilisation de cellules souches embryonnaires. Mais aussi des enjeux économiques et de production subsistent. Le coût élevé et la difficulté d'adapter les systèmes de production à grande échelle constituent des obstacles importants à surmonter (Csobonyeiova et al. 2017).

3.1.2. La thérapie génique

Dans le cadre de la médecine régénérative, la thérapie génique vise à délivrer un gène thérapeutique afin de favoriser la réparation du tissu lésé. L'utilisation des acides nucléiques en médecine régénérative a de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles (cellules et protéines recombinantes), notamment en termes de coûts et vitesse de production (D'Mello et al. 2017), mais aussi en termes d'efficacité de différenciation et de sécurité (Inagaki 2024).

En ce qui concerne l'ARNm, une fois qu'il est produit et que le système de délivrance est établi, une large variété d'application peut être accessible en changeant simplement le gène en fonction de la cible thérapeutique. Son utilisation permet aussi d'atteindre des cibles thérapeutiques intracellulaires, ce qui est difficilement le cas pour les protéines

recombinantes. De plus, contrairement à l'ADN, l'ARNm ne présente pas de risque de mutagenèse lié aux insertions aléatoires dans le génome (Sahin, Karikó, et Türeci 2014).

Les « RNA-activated matrices » (RAM) en médecine régénératrice

Afin d'être délivré au site d'intérêt, l'ARNm thérapeutique peut être formulé dans une matrice, l'ensemble formant une « RAM » (RNA-activated matrices). Ces RAM sont préparées comme indiqué sur l'illustration suivante (figure 40). Les ARNm contenus dans les RAM codent généralement pour des facteurs de croissance spécifiques, impliqués dans le développement du tissu d'intérêt.

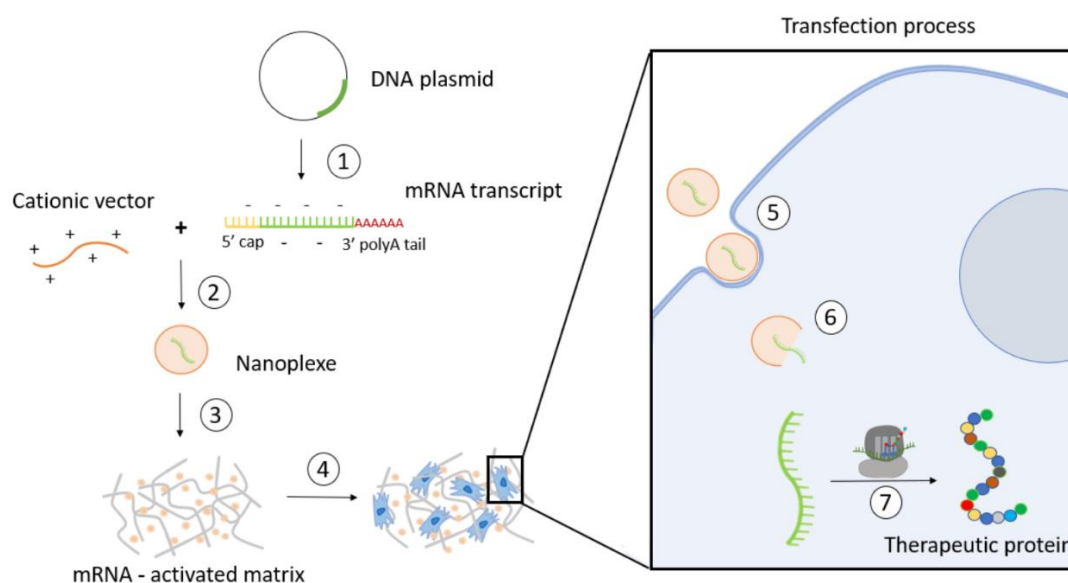


Figure 40 : Illustration de la préparation et du mécanisme d'action des RAM, de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)

Le mécanisme d'action est le suivant :

1 – Transcription in vitro. 2 – Formation de complexes. 3 – Incorporation des complexes dans la matrice. 4 – Colonisation de matrice par les cellules. 5 – Internalisation des complexes par les cellules. 6 – Relargage de l'ARNm dans le cytosol. 7 – Production de protéine d'intérêt.

Les RAM également appelées TAM (transcript-activated matrices) sont très prometteuses. En effet, elles permettent une production de protéine ciblée et transitoire in situ, tout en minimisant les risques associés aux thérapies à base d'ADN, notamment les insertions aléatoires. Aussi, les matrices dans lesquelles sont incorporé les ARNm peuvent séquestrer et stabiliser les protéines exprimées ce qui peut améliorer leur effet biologique (Khalil et al. 2020).

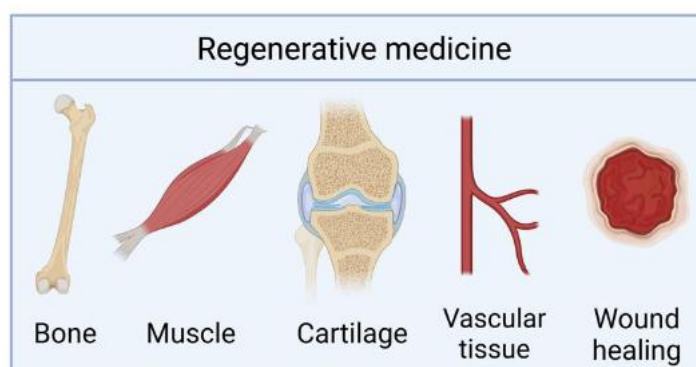


Figure 41 : Applications majeures des RAM (RNA activated matrix), adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)

Les RAM sont étudiées dans différents domaines de la médecine régénératrice (figure 41). La majorité des études se portent sur la régénération du tissu osseux, une application que nous détaillerons par la suite. Cependant, d’autres domaines sont étudiés, notamment la régénération du cartilage, des muscles (Ledo et al. 2020), de vaisseaux sanguins (S Zaitseva et al. 2020) et la peau pour améliorer la cicatrisation (Khalil et al. 2020).

Tableau 3 : Liste d’applications thérapeutiques de RAM, adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)

Applications	Protéine codée	Vecteur	Références
Cartilage et muscle	SOX-9 ou MYOD	3DfectIN™	(Ledo et al. 2020)
	HGF	Lipofectamine™ Messenger Max	(S Zaitseva et al. 2020)
Régénération vasculaire	VEGF-A	Lipofectamine™ RNAiMAX	(Lui et al. 2013)
Cicatrisation de la peau	bFGF	Lipofectamine™ Messenger Max	(Khalil et al. 2020).
	HGF	LNP	(Xue et al. 2024)
Os	BMP-2	PEI	(Elangovan et al. 2015)

Remarque : il est intéressant de noter que les RAM son également étudiées pour des traitement anticancéreux et des thérapies vaccinales (Dastmalchi et al. 2021).

Indépendamment des applications, les mécanismes d'actions de ces RAM sont similaires. L'objectif est de produire la protéine en quantité suffisante grâce à l'ARNm pour obtenir un effet thérapeutique. Pour ce faire, le choix de la protéine codées est un prérequis, qui est déterminé par la cible thérapeutique visée. Dans l'ensemble, les ARNm codent des protéines impliquées dans la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Globalement, ces protéines sont impliquées dans la morphogénèse des tissus.

On note que les vecteurs non-viraux sont privilégiés, avec notamment une utilisation plus importante de vecteurs lipidiques.

Au cours de cette thèse, pour illustrer l'utilisation de l'ARNm en médecine régénérative, nous avons choisi la régénération osseuse comme exemple d'application.

3.2. La régénération osseuse : L'os et la réparation des défauts osseux

3.2.1. La biologie de l'os à l'échelle macroscopique

Le squelette est la charpente du corps. Il est composé de 206 os chez l'adulte, que l'on peut classer selon leurs morphologies et leurs structures. On différencie par exemple, les os longs des membres (fémur, humérus), les os courts des articulations (os des chevilles et poignets), et les os plats (crâne, sternum, omoplates, os du bassin).

Le tissu osseux se compose de deux structures principales. L'os compact (ou cortical), qui est dense et solide, forme la couche externe de l'os. Il fournit une résistance et une rigidité structurelle, protégeant ainsi l'os des fractures et des chocs. Il joue également un rôle dans le soutien du poids du corps. L'os spongieux (ou trabéculaire) est interne et poreux. Il est composé d'un réseau de travées ou de trabécules contenant la moelle osseuse. Cette double structure permet aux os d'être légers mais résistants.

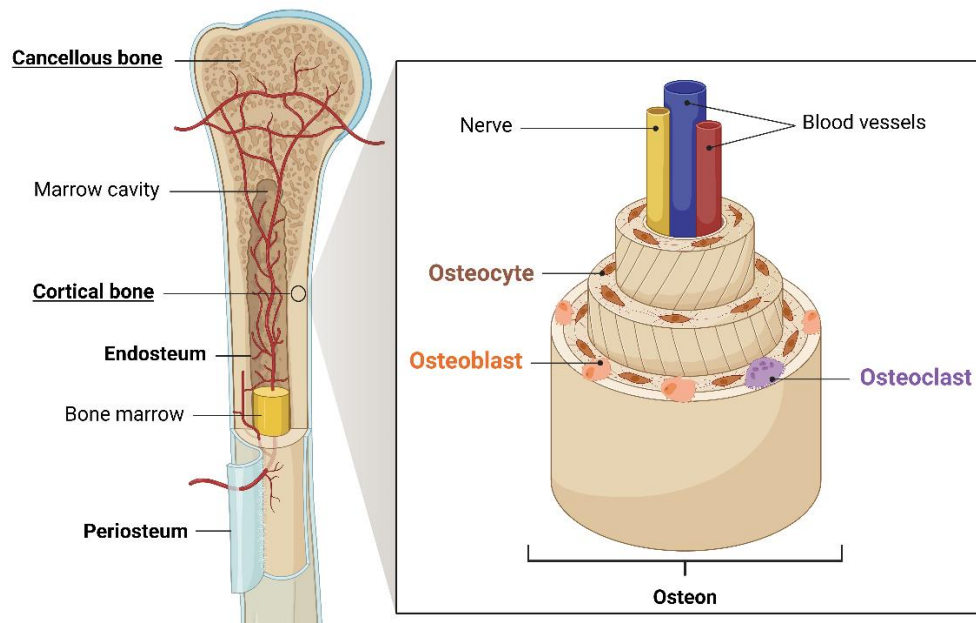


Figure 42 : *Illustration de la structure d'un os long, réalisé sur Biorender, adapté de (Serim et al. 2024)*

Deux membranes recouvrent les os, le périoste à l'extérieur, et l'endoste à l'intérieur (voir figure 42). L'endoste et le périoste participent à l'homéostasie de l'os en contribuant à la croissance, au remodelage et à la réparation des lésions osseuses.

Les os sont composés de tissu osseux, cartilagineux, nerveux et sanguins. Outre leur rôle structurel pour soutenir le corps, permettre le mouvement, protéger les organes internes vitaux, ils sont le site de production de cellules sanguines par la moelle. Par ailleurs, ils représentent un organe dynamique impliqué dans diverses fonctions comme le stockage de minéraux et la régulation de la glycémie (Dorozhkin et Eppele 2002).

3.2.2. La biologie de l'os à l'échelle microscopique : les cellules osseuses

Parmi les cellules osseuses on retrouve : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les cellules souches mésenchymateuses.

Ostéoblastes : Les ostéoblastes sont responsables de la formation du tissu osseux. Elles produisent les éléments constitutifs de la matrice osseuse comme le collagène, et d'autres protéines spécifiques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine ou l'ostéocalcine, mais aussi des enzymes qui permettent sa minéralisation (alcaline phosphatase). Les ostéoblastes produisent aussi des facteurs de régulation et de signalisation tels que des facteurs de

croissance et des cytokines. Des marqueurs ostéoblastiques comme l'alkaline phosphatase ou le facteur de transcription Runx2 permettent de les identifier.

Ostéocytes : Les ostéocytes sont les cellules osseuses les plus abondantes dans le tissu osseux. Elles proviennent des ostéoblastes, qui se sont « emmurées » dans la matrice osseuse qu'elles ont produite. Les ostéocytes sont situés dans de petites cavités dispersées dans la matrice osseuse et sont connectées les unes aux autres par des prolongements cytoplasmiques situés dans des canalicules. Elles participent à la nutrition, la résorption et au remodelage du tissu osseux.

Ostéoclastes : Les ostéoclastes ont pour rôle de dégrader le tissu osseux minéralisé, participant ainsi au remodelage, et à la libération de minéraux dans le sang.

Cellules souches mésenchymateuses (MSC) : Présentes en faible quantité dans la fraction stromale de la moelle osseuse, elles sont impliquées dans les mécanismes de renouvellement et réparation du tissu osseux.

Ces différents types cellulaires collaborent pour maintenir l'homéostasie du tissu osseux.

3.2.3. La réparation osseuse

Les besoins de réparation osseuse grandissent de façon exponentielle en raison de l'augmentation de l'espérance de vie de la population. En effet, le vieillissement induit une diminution de la densité osseuse, augmentant donc le risque de fracture. En 2024, le nombre de fractures survenant chaque année en France, a été estimé à environ 500 000, ce qui correspond à une fracture par minute ("International Osteoporosis Foundation" (IOF), le 02/01/2025).

Dans la majorité des cas cliniques, une fracture osseuse se répare spontanément. En effet, après une lésion osseuse, un processus de réparation se met en place.

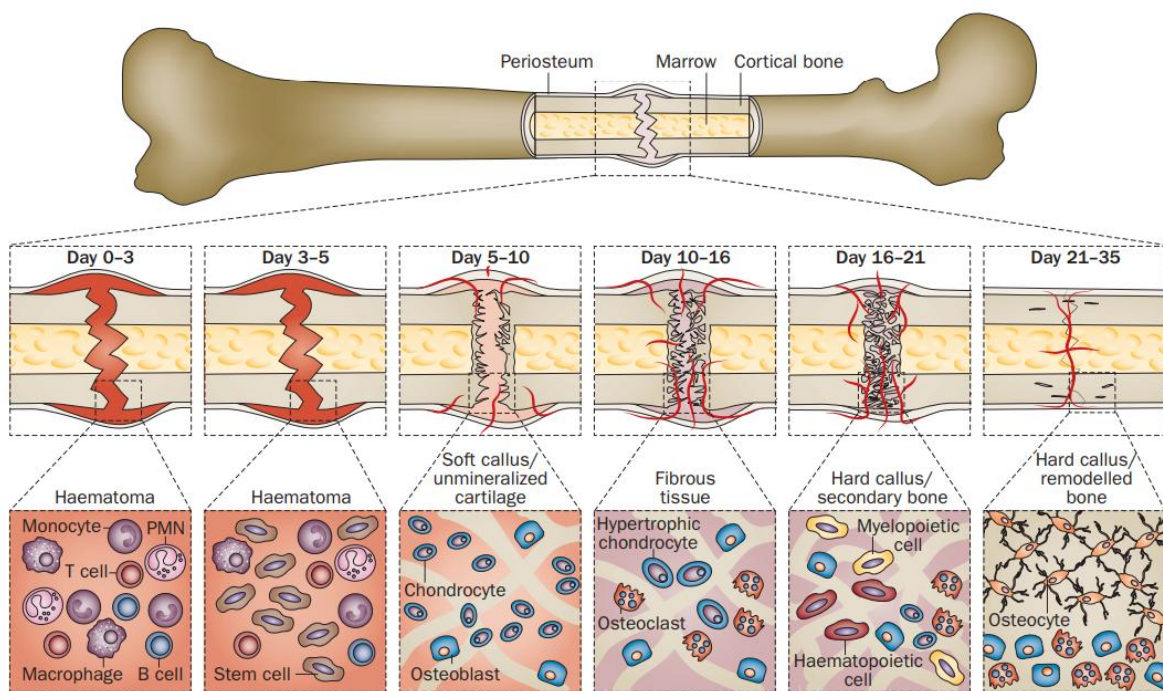


Figure 43 : *Illustration de la réparation d'un os long, adapté de (Einhorn et Gerstenfeld 2015)*

Tout d'abord, un **hématome** se forme au cours d'une phase inflammatoire (0-5 jours après fracture). Les facteurs inflammatoires aigus, tels que le $\text{TNF-}\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6, libérés par les cellules inflammatoires dans le caillot sanguin, recrutent des macrophages, monocytes et lymphocytes. Ces cellules immunitaires éliminent les tissus nécrotiques et sécrètent des cytokines comme les BMP (bone morphogenetic protein) et le VEGF (vascular endothelial growth factor), stimulant ainsi la cicatrisation et l'angiogenèse. De plus, les cellules souches progénitrices (MSC) migrent vers le site de la fracture.

Ensuite, l'hématome est remplacé par un « **cal mou** » comblant le défaut entre les berges osseuses, stabilisant la fracture. Ce tissu riche en collagène, fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes et vaisseaux sanguins se forme 5 à 10 jours après fracture. Après quelques semaines, le cal mou se minéralise au cours d'une phase d'ossification grâce à l'action des ostéoblastes pour former le « **cal dur** » (10-21 jours).

Enfin, au cours des mois et années qui suivent, une étape de remodelage caractérisé par un équilibre dynamique entre une résorption ostéoclastique et une formation osseuse ostéoblastique, l'os fracturé reprend sa forme et ses propriétés initiales (Einhorn et Gerstenfeld 2015).

Toutefois, malgré cela, certaines fractures ou certains défauts ne peuvent pas se réparer d'eux-mêmes. C'est en particulier le cas des défauts osseux de taille trop importante, dit de taille critique, qui ne se réparent pas même après de nombreux mois. Ces défauts de

réparation peuvent aussi être liés à différentes comorbidités (telles que l'âge, le diabète, les infections et le tabagisme) qui conduisent à une absence de guérison ou une guérison incomplète (Sheen, Mabrouk, et Garla 2024).

En conséquence, des stratégies thérapeutiques sont mises en place dans le but d'améliorer la régénération des défauts osseux.

3.3. Les stratégies thérapeutiques en régénération osseuse

3.3.1. Les greffes et les substituts osseux

L'autogreffe est la technique de référence pour permettre la régénération de défauts qui ne peuvent se régénérer seuls. Elle consiste à prélever du tissu osseux à un patient et à lui réimplanter au niveau du site lésé, ce qui permet de limiter les rejets de greffe. Ce tissu vivant possède des propriétés biologiques d'osteoinduction et ostéogéniques qui favorisent la régénération osseuse. Cependant, la morbidité du site de prélèvement et la quantité limitée de tissu osseux pouvant être obtenu limitent l'utilisation des autogreffes (Schmidt 2021).

Des substituts osseux allogéniques (provenant d'autres patients) ou xénogéniques (provenant d'animaux) peuvent être utilisés comme alternative après avoir été traités pour réduire leur immunogénicité. Des substituts osseux synthétiques peuvent également être employés. Ces matériaux, qu'ils soient de type inorganique (céramiques) ou polymérique, doivent être ostéoconducteurs, c'est-à-dire qu'ils favorisent la croissance du tissu osseux à leur surface. Ils servent donc de support cellulaire au cours du processus de régénération. Ils sont néanmoins peu ou pas ostéoinducteurs, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas la capacité d'induire le recrutement ou la stimulation de cellules ostéoprogénitrices.

Pour améliorer le potentiel thérapeutique des substituts osseux synthétiques, il est possible d'y associer des éléments bioactifs comme des cellules ou des facteurs de croissance (ex : MSC, BMP-2) qui vont favoriser la réparation osseuse.

3.3.2. Les Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Les Bone Morphogenetic Protein (BMP), sont des protéines utilisées pour améliorer le potentiel ostéoinducteur des substituts osseux synthétiques. Elles induisent efficacement

l'ostéogénèse via le recrutement et la différenciation de cellules ostéoprogénitrices, ainsi qu'en favorisant la prolifération des ostéoblastes (Oryan et al. 2014).

Structure et fonction

Les BMP appartiennent à la superfamille des TGF- β , et sont impliquées dans le développement de divers types tissulaires. A l'exception de BMP-1, les BMP sont des facteurs de croissance d'une trentaine de kDa qui agissent de manière autocrine et paracrine. On dénombre une vingtaine de BMP, parmi lesquelles plusieurs ont été étudiées pour leur potentiel thérapeutique en régénération osseuse (BMP-2, BMP-7, BMP-9).

D'un point de vue structurel, les molécules de BMP sont des dimères, constitués de monomères liés par des ponts disulfures. Des homodimères (ex : BMP-2/2) et des hétérodimères (ex : BMP-2/7) peuvent alors se former (Tajer et al. 2021). En se fixant à leurs récepteurs membranaires spécifiques, les dimères de BMP activent des voies de signalisation incluant les voies canoniques (Smad-dépendante) et non canoniques (voie des MAP kinases, voie PI3K/Akt). La voie canonique conduit à la phosphorylation de complexes SMAD1/5/8 (Miyazono, Kamiya, et Morikawa 2010), qui migrent vers le noyau en formant un nouveau complexe avec SMAD4 pour induire l'expression de gènes spécifiques (BMP responsive genes : BRE). La voie des SMAD induit notamment l'expression de facteurs de transcription ostéogéniques tels que Runx2, Osterix (OSX) et le gène Inhibiteur de différenciation 1 (Id1). L'activation de ces gènes cibles et l'accumulation des protéines produites induit la différenciation des cellules d'intérêt. Les BMP sont ainsi capables d'induire la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes, responsables de la synthèse de la matrice osseuse, entraînant l'ostéogénèse et la formation de tissu osseux de novo (Carreira et al. 2014). En d'autres termes, les BMPs peuvent initier et favoriser la régénération osseuse.

Utilisation des BMP en régénération osseuse

Au début des années 2000, la FDA aux Etats Unis ainsi que les agences de régulation du médicament européennes autorisent l'utilisation de BMP-2 et BMP-7, en alternative aux autogreffes, pour différentes applications en régénération osseuse (Gillman et Jayasuriya 2021). Ces BMP sont utilisées sous forme de protéine recombinante comme facteur ostéoinducteur pour le traitement des fractures ouvertes des os longs (White et al. 2007), la fusion vertébrale (Burkus et al. 2002), et la reconstruction maxillo-faciale et dentaire (Boyne et al. 2005).

Dans le cas du produit « INFUSE® Bone Graft » commercialisé par Medtronic, des éponges de collagène sont chargées de protéine BMP-2 recombinante humaine. L'implant

vient combler la cavité et va progressivement délivrer la protéine au niveau du site lésé. Les protéines induisent alors le recrutement et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes, qui vont induire la régénération du tissu ("Medtronic", le 24/09/2024).

Cependant, la faible demi-vie des BMP (~quelques heures), ainsi que leur faible affinité pour le collagène nécessite l'utilisation de doses supra physiologiques pour obtenir un effet thérapeutique. Allant jusqu'à 12 mg par implant, ces doses sont considérablement plus élevées que les doses physiologiques (quelques μg / kg d'os), et se sont avérées être associées à des effets indésirables (Boerckel et al. 2011). Ces effets, qui peuvent entraîner des complications de gravité variable, incluent l'ostéolyse, des gonflements liés à une inflammation, et la formation d'os ectopique au-delà de la zone d'intérêt (James et al. 2016).

En conclusion, l'utilisation des BMP sous forme protéique en médecine régénératrice est bénéfique car elle permet d'améliorer le processus de régénération et est une alternative intéressante à l'autogreffe avec ses limites associées. En revanche, ces bénéfices s'accompagnent de risques liés en partie à l'utilisation de doses supra physiologiques qui peuvent induire une forte inflammation et une résorption osseuse (Evans et Huard 2015). Par conséquent, l'un des enjeux majeurs concernant l'utilisation des BMP en thérapie osseuse est de réduire les quantités de protéine recombinante utilisées, tout en conservant son effet thérapeutique. Pour ce faire, diverses stratégies ont été développées, notamment la conception de supports ou systèmes de délivrance qui présentent une meilleure affinité pour les BMP que les éponges de collagène traditionnelles (Arrabal et al. 2013).

Une autre approche consiste à administrer les BMP sous forme d'acides nucléiques.

3.4. L'ARN messenger en régénération osseuse

3.4.1. Acides nucléiques et régénération osseuse

L'utilisation de l'ADN codant pour les BMP comme alternative à l'utilisation des protéines recombinantes est rapidement avancée, puis celle de l'ARNm par la suite. En effet, l'utilisation d'acides nucléiques permet l'expression de protéines ostéoinductrices sans recourir à des quantités supra physiologiques puisque ce sont des doses de l'ordre de quelques nanogrammes qui sont localement produites (De La Vega et al. 2022). De plus, la production d'acides nucléiques s'avère plus économique que celle des protéines recombinantes (D'Mello et al. 2017).

Plusieurs stratégies sont alors développées. Les **thérapies ex-vivo**, qui consistent à prélever des cellules ou tissus du patient, de les traiter avec le gène d'intérêt avant de les lui réintroduire. Les **thérapies in-vivo**, qui consiste soit à injecter directement le gène au niveau du site lésé, soit à l'implantation d'une matrice dans laquelle est incorporé le gène (Gene activated matrix : GAM).

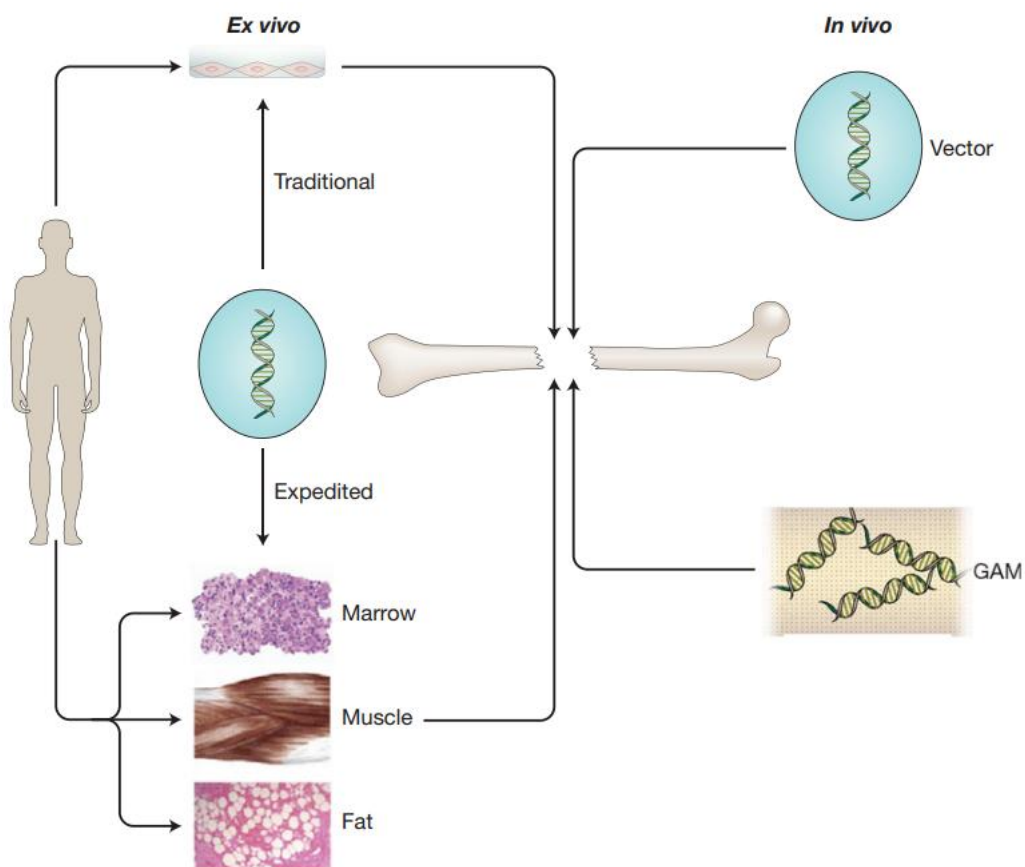


Figure 44 : Stratégie de transfert de gène dans un défaut osseux, de (Evans 2010).

3.4.2. ARNm et régénération osseuse

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux matrices chargées d'ARNm, les RAM. En 2015, Elangovan et al. publient une étude qui démontre le potentiel de thérapie à base d'ARNm en régénération osseuse. Ils comparent in vivo la régénération osseuse induite par de l'ADN à celle induite par de l'ARNm codant la protéine BMP-2, après 4 semaines d'implantation. Quatre conditions sont testées : le défaut vide, une matrice de collagène chargée avec le vecteur (polyéthylène imine : PEI), une éponge chargée avec le polyplexe PEI-ADN, et une éponge chargée avec le polyplexe PEI-ARNm. Le tissu osseux nouvellement formé est visualisé par μ CT (a) et le volume osseux quantifié en (b).

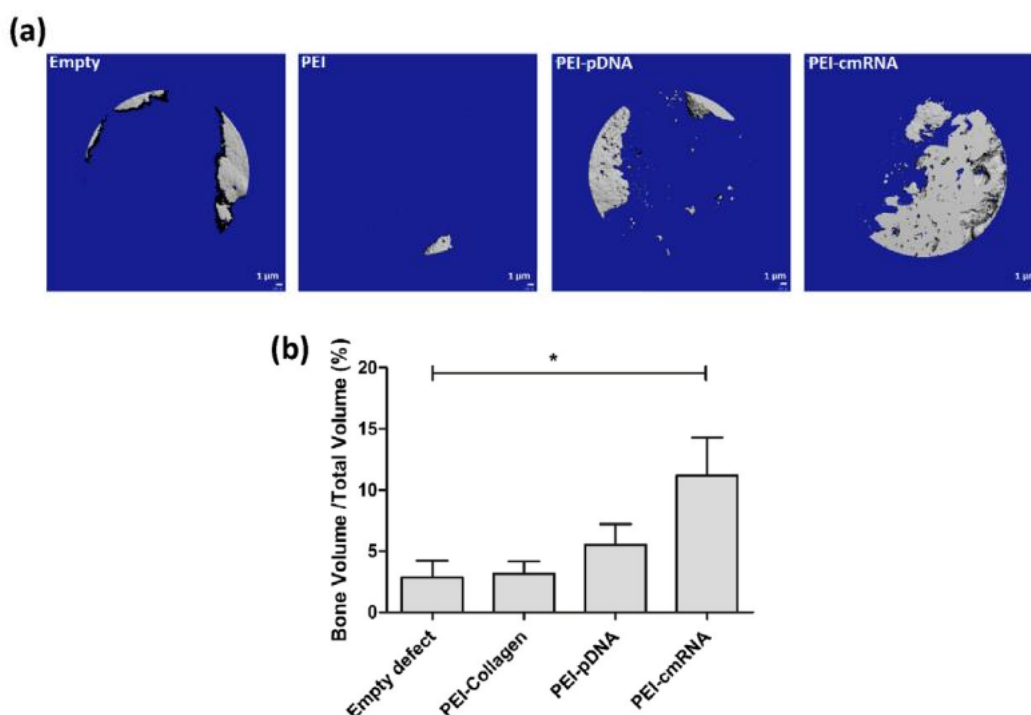


Figure 45 : Régénération osseuse induite par de l'ADN et de l'ARNm codant la protéine BMP-2, après 4 semaines d'implantation des matrices sur des rats (Elangovan et al. 2015).

Les résultats montrent que le volume d'os nouvellement formé est 4 fois plus important avec l'ARNm et 2 fois plus important avec l'ADN par rapport au défaut vide. Les deux acides nucléiques induisent donc une régénération, l'ARNm surpasse l'ADN. Cela fut constaté in vivo mais aussi au cours d'analyses in vitro (Elangovan et al. 2015; D'Mello et al. 2017).

Par la suite, de nombreuses études, utilisant de l'ARNm codant pour différents facteurs de croissance, ont été publiées dans le domaine de la régénération osseuse.

Tableau 4 : RAM en régénération osseuse, adapté de (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023)

Matrice	Protéine codée	Modification de l'ARNm	Vecteur	Publication
Collagène	BMP-2	ARCA, s2U (0.25) m5C (0.25) or Ψ (1.0) m5C (1.0), Poly(A)-120	PEI	(Elangovan et al. 2015)
Éponge de collagène	BMP-2	s2U m5C, Poly(A) - 200	DPPC/cholesterol/ DMG-PEG or PEI	(Badieyan et al. 2016)
Gel de fibrine	BMP-2	ARCA, s2U (0.25) m5C (0.25)	DOPE/cholesterol/ DMPE-PEG	(Balmayor et al. 2016)
Gel de fibrine ou granule de céramique	BMP-2	ARCA, s2U (0.25) m5C (0.25), Poly(A)	DreamFect™ Gold	(Balmayor et al. 2017)
Collagène	BMP-2 ou BMP-9	ARCA, Ψ (1.0) m5C (1.0), Poly(A) - 120	PEI	(Khorsand et al. 2017)
Éponge de collagène	BMP-2	ARCA, TISU sequence, 5IU (0.35) 5IC (0.075) or s2U (0.25) m5C (0.25), Poly(A) - 120	DPPC/cholesterol/ DMG-PEG	(Wen Zhang et al. 2019)
Membrane de collagène	BMP-9	ARCA, Ψ (1.0) m5C (1.0), Poly(A) - 120	PEI	(Khorsand et al. 2019)
Matrice osseuse déminéralisée	ARNm ostéoinductif	Aucune	PEI	(Leng, Liang, et Lv 2021)
Matrice de fibres de collagène	BMP-2 et VEGF-A	m1Ψ (1.0), Poly(A)	Lipofectamine™ MessengerMAX	(Geng et al. 2021)
Collagène et nano hydroxyapatite	BMP-2 et NS1	Poly(A)	Lipopolyplexes ou Lipofectamine™ MessengerMax	(P. Wang et al. 2021)
Collagène	BMP-7	Cap 1	PepFect14 ou Lipofectamine™ MessengerMAX	(Oude Egberink et al. 2022)
Éponge de collagène	BMP2	TISU sequence, 5IU (0.35) 5IC (0.075)	DPPC/cholesterol/ DMG-PEG	(De La Vega et al. 2022)

Le tableau 4 liste les différentes études portant sur les RAM en régénération osseuse. Les facteurs critiques de conception comprennent : la composition de la matrice, la protéine codée par l'ARNm, les modifications de ce dernier, puis le vecteur utilisé pour sa délivrance (Martinez-Campelo et Garcia-Fuentes 2023).

En analysant ces éléments, on observe plusieurs faits remarquables.

Tout d'abord, le collagène, qui est le principal constituant de la matrice extracellulaire osseuse, est l'un des matériaux les plus utilisés dans la conception des RAM. Il est utilisé comme élément ostéo-conducteur sous différentes formes : de fibres, d'éponges ou de membranes en fonction de la stratégie souhaitée.

Lorsque l'on s'intéresse aux protéines codées par les ARNm thérapeutiques, on constate que l'utilisation des BMP est privilégiée. En effet, leur potentiel ostéoinducteur en fait un outil intéressant qui explique leur utilisation répandue, notamment la BMP-2 qui est la plus étudiée. Cependant les protéines BMP-7 et BMP-9 suscitent aussi un intérêt en régénération osseuse (Khorsand et al. 2017; Oude Egberink et al. 2022).

En ce qui concerne l'ARNm, la dose utilisée pour obtenir un effet est un élément important à prendre en compte. In vitro, des manipulations préliminaires utilisant des gènes rapporteurs peuvent être réalisées pour déterminer une dose qui permet une bonne efficacité de transfection, en limitant la cytotoxicité induite (Badieyan et al. 2016). Les doses sont généralement de l'ordre du picogramme par cellule. In vivo, on remarque que les doses sont de l'ordre de 25µg d'ARNm pour un défaut osseux au niveau de la calvaria chez le rongeur (Elangovan et al. 2015) à 50µg pour une ostéotomie du fémur de rat (5,0mm) (De La Vega et al. 2022).

Il est aussi intéressant de noter la multiplicité des techniques employées pour améliorer l'expression de l'ARNm comme : les modifications de la coiffe, des UTR, de la queue polyA, ou l'utilisation de nucléotides modifiés. Vraisemblablement, l'incorporation de nucléotides modifiés demeure la technique de référence et est employée presque systématiquement. La sélection de modifications optimales, a pour but de réduire l'instabilité et l'immunogénicité des molécules d'ARNm. C'est un enjeu crucial pour améliorer l'efficacité et la sécurité des produits thérapeutiques à base d'ARNm.

Parmi ces modifications, on retrouve principalement dans les RAM la s2U (2-thiouridine), la m5C (5-methylcytidine) et la Ψ (pseudouridine). Ces trois modifications naturellement présentes dans la cellule, sont connues pour réduire l'inflammation générée par l'ARNm produit par IVT (Karikó et al. 2005). De nombreuses modifications ont été découvertes,

depuis et des nucléotides synthétiques ont été créés : c'est le cas de la 5iU (5-iodo-uridine) et la 5iC (5-iodo-cytidine) (Cappannini et al. 2024).

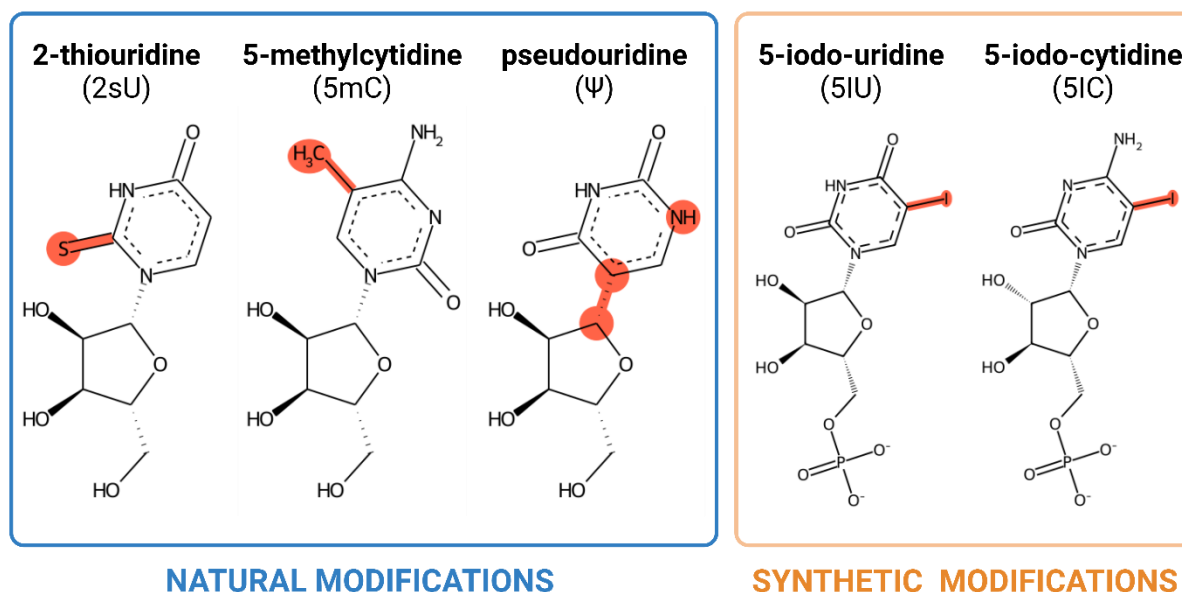


Figure 46 : Nucléotides modifiés utilisés dans la conception de RAM, réalisé sur *BioRender.com*.

Enfin, lorsque l'on s'intéresse aux vecteurs, on remarque que les vecteurs lipidiques sont majoritairement employés dans les RAM pour délivrer l'ARNm. On constate aussi que la Lipofectamine Messenger MAX est le vecteur commercial qui est le plus souvent utilisé. Pour cette raison, elle sera utilisée comme contrôle pour les manipulations réalisées dans la partie expérimentale.

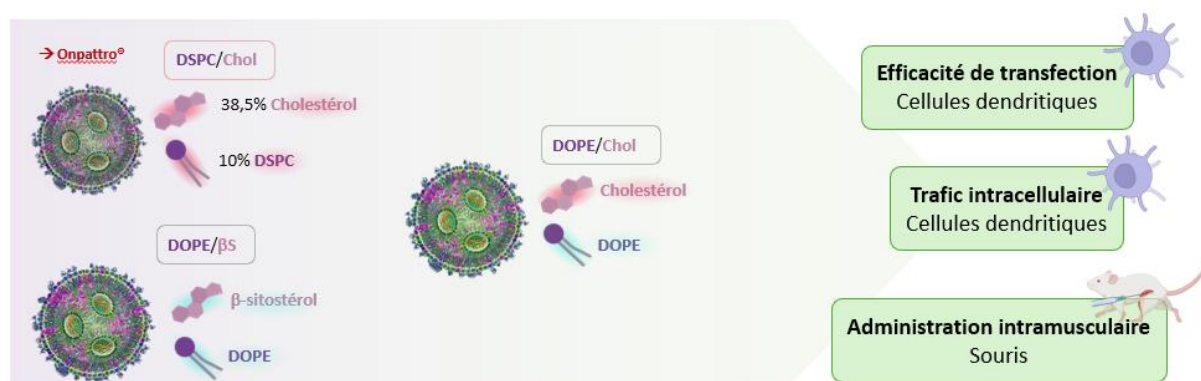
Il est important de mentionner que le choix du vecteur influence l'efficacité et la cytotoxicité de la thérapie. De ce fait, les paramètres physico-chimiques des complexes formés entre l'ARNm et le vecteur peuvent moduler les performances du système. Pour ces raisons, ces paramètres doivent être optimisés dès les premières phases de conception, ce qui sera traité au cours du chapitre 5.

Problématique

Les progrès établis en vectorisation de l'ARNm, via des systèmes de délivrance toujours plus performants, ont contribué à l'essor des thérapies à base d'ARNm. Aujourd'hui, ces thérapies sont considérées comme disruptives en vaccination et s'illustrent parmi les plus prometteuses dans le domaine de la médecine régénérative.

Malgré cela, des défis persistent. Plusieurs aspects cruciaux tels que, le stockage, l'efficacité de transfection, l'échappement endosomal, ou la biocompatibilité des formulations nécessitent une attention particulière. Ils représentent des enjeux majeurs à aborder pour contribuer à l'amélioration de ces thérapies. Dans ce but, nos travaux se sont focalisés sur l'étude de la formulation de LNP pour la vaccination, et l'étude de liposomes cationiques pour la médecine régénérative.

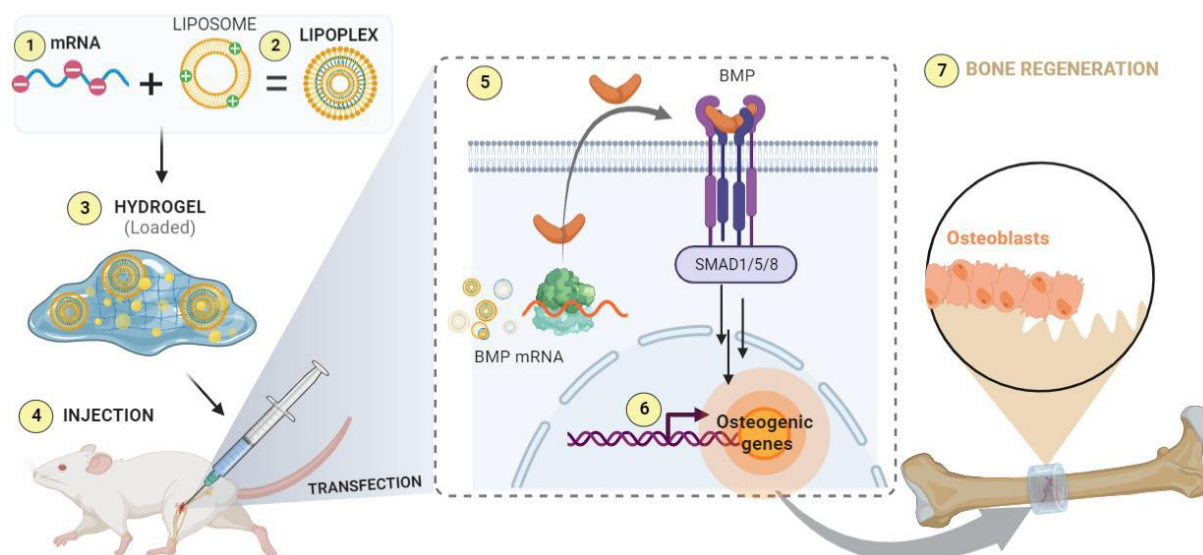
Notre première étude s'intéresse au choix des lipides auxiliaires dans la formulation de LNP pour la vaccination. L'objectif était de comparer l'efficacité de transfection et le trafic intracellulaire de trois formulations de LNP, composées de lipides auxiliaires différents pour la transfection de cellules dendritiques et l'administration d'ARNm par voie intramusculaire.



Mais l'utilisation de l'ARNm s'étend au-delà de la vaccination. Dans la dernière partie de l'étude bibliographique, nous avons pu voir que l'utilisation de l'ARNm en médecine régénérative a de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles (cellules progénitrices, protéines recombinantes, ADNc). Par conséquent, l'ARNm représente une alternative prometteuse dans ce domaine. Pour illustrer cela, nous avons choisi d'étudier la régénération osseuse.

Dans ce domaine, les thérapies actuelles visent à combler le défaut à l'aide d'une matrice composée de biomatériaux ostéoconducteurs. Pour augmenter le potentiel ostéoinducteur de

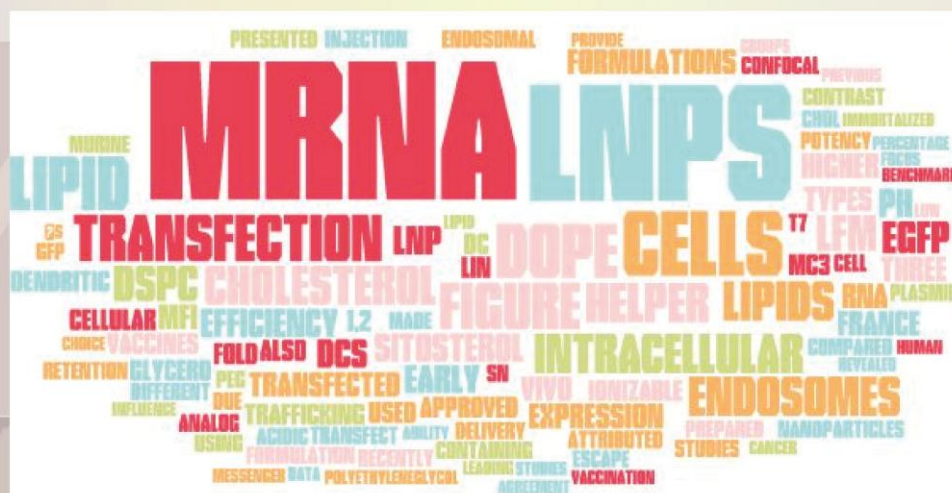
ces matrices, les protéines recombinantes comme les BMP peuvent y être associées. Si elles permettent d'améliorer le processus de régénération, ces bénéfices s'accompagnent d'effets indésirables liés en partie à l'utilisation de doses supra physiologiques. Par conséquent, l'un des enjeux majeurs concernant l'utilisation des BMP en thérapie osseuse est de réduire les quantités de protéine recombinante utilisée, tout en conservant leurs effets thérapeutiques. L'ARNm s'annonce donc comme une alternative intéressante pour cette application. Au cours de ma thèse j'ai participé au projet CreaBone, financé par l'ANR, incluant plusieurs partenaires : le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) à Orléans, le laboratoire de Biologie Bio-ingénierie et Bio-imagerie Ostéo-articulaire (B3OA) à Paris et le RMeS (Regenerative Medicine and Skeleton) à Nantes. Ce projet vise à développer un hydrogel chargé d'ARNm codant des BMPs, comme alternative à l'utilisation de protéines recombinantes pour régénérer des défauts osseux.



Au sein de ce projet, mon rôle a été de produire les ARNm codant pour différents types de BMPs et de développer et caractériser le vecteur lipidique qui l'encapsule à l'intérieur de l'hydrogel.

En somme, mes travaux de thèse se divisent en deux sections. La première s'intéresse à l'étude des nanoparticules lipidiques (LNP) pour la vaccination. La seconde, se focalise sur la formulation d'ARNm pour la régénération osseuse en optimisant et caractérisant un liposome cationique destiné à délivrer de l'ARNm dans ce contexte.

Etude expérimentale



mRNA Delivery



CHAPITRE 4 : Influence des lipides auxiliaires sur les performances et le trafic intracellulaire des LNP

L'autorisation des vaccins Comirnaty[®] de Pfizer/BioNTech et Spikevax[®] de Moderna produits pour lutter contre le virus SARS-CoV-2 ainsi que mRESVIA[®] de Moderna produit pour lutter contre le virus respiratoire syncytial, témoigne de l'efficacité des nanoparticules lipidiques (LNP) pour la délivrance d'ARNm dans le cadre de la vaccination. Toutefois, ces systèmes de délivrance possèdent des limites, notamment l'échappement endosomal. En effet, plusieurs études démontrent le faible taux d'ARN délivré au sein du cytosol (1-2%) au cours de la transfection des cellules cibles par les LNP (Gilleron et al. 2013; Chatterjee et al. 2024). Des études démontrent que les lipides auxiliaires influent sur la structure, la stabilité et le trafic intracellulaire des LNP modulant ainsi leur efficacité à délivrer l'ARNm (Barbieri et al. 2024). Les phospholipides auxiliaires, comme le DOPE et le DSPC sont connus pour contribuer à la stabilité et l'efficacité des formulations (X. Cheng et Lee 2016). Le DSPC possède une géométrie cylindrique, alors que le DOPE possède une morphologie conique (Lee, Moon, et Kim 2022). Ces différences structurelles au niveau de la morphologie, de leur queue et de leur tête polaire induisent des conformations différentes au niveau des nanoparticules formulées (Salim et al. 2014). Globalement, le DSPC est considéré plus stable (Álvarez-Benedicto et al. 2022) et le DOPE, qui possède des propriétés fusogènes induirait de meilleures efficacités de transfection au dépend d'une moindre stabilité (R. Zhang et al. 2021).

Outre les phospholipides auxiliaires, les LNP contiennent également du cholestérol. L'incorporation de phytostérol à la place du cholestérol dans les formulations de LNP influence leurs propriétés structurelles et leurs efficacités de transfection. Parmi les différentes études menées sur les phytostérols dans la formulation de LNP, le β -sitostérol est celui qui induit les meilleures performances (Eygeris et al. 2020). Ces résultats s'expliqueraient par son potentiel à améliorer les propriétés fusogènes des LNP (Patel et al. 2020).

Par conséquent, ces lipides auxiliaires (DSPC, DOPE, β -sitostérol) représentent un moyen d'améliorer l'échappement endosomal des nanoparticules.

Dans ce cadre, notre étude publiée dans le journal « nanomaterials » en 2022, compare trois formulations de LNP qui diffèrent par leurs lipides auxiliaires. Nous avons comparé in cellulo et in vivo la délivrance d'ARNm codant pour des protéines rapportrices pour une application en vaccination.

L'objectif était de déterminer la formulation qui induira la meilleure expression. En parallèle, le trafic intracellulaire a été étudié.



Article

In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA

Ayoub Medjmedj^{1,†}, Albert Ngalle-Loth^{1,†}, Rudy Clemençon¹, Josef Hamacek^{1,2}, Chantal Pichon^{1,2} and Federico Perche^{1,*} 

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France; ayoub.medjmedj@cnrs-orleans.fr (A.M.); albert.ngalle-loth@cnrs-orleans.fr (A.N.-L.); rudy.clemencon@cnrs.fr (R.C.); josef.hamacek@cnrs.fr (J.H.); pichon@cnrs.fr (C.P.)

² Centre de Biophysique Moléculaire, University of Orléans, 45100 Orléans, France

* Correspondence: federico.perche@cnrs-orleans.fr; Tel.: +33-2-38-25-55-44

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Lipid Nanoparticles (LNPs) are a leading class of mRNA delivery systems. LNPs are made of an ionizable lipid, a polyethyleneglycol (PEG)-lipid conjugate and helper lipids. The success of LNPs is due to proprietary ionizable lipids and appropriate helper lipids. Using a benchmark lipid (D-Lin-MC3) we compared the ability of three helper lipids to transfect dendritic cells in cellulo and in vivo. Studies revealed that the choice of helper lipid does not influence the transfection efficiency of immortalized cells but, LNPs prepared with DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) and β -sitosterol were more efficient for mRNA transfection in murine dendritic cells than LNPs containing DSPC (distearoylphosphatidylcholine). This higher potency of DOPE and β -sitosterol LNPs for mRNA expression was also evident in vivo but only at low mRNA doses. Overall, these data provide valuable insight for the design of novel mRNA LNP vaccines.

Keywords: mRNA therapy; intracellular trafficking; LNP



Citation: Medjmedj, A.; Ngalle-Loth, A.; Clemençon, R.; Hamacek, J.; Pichon, C.; Perche, F. In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 2446. <https://doi.org/10.3390/nano12142446>

Academic Editor: Seog-Young Yoon

Received: 23 June 2022

Accepted: 14 July 2022

Published: 17 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Messenger RNA (mRNA) is a promising means of vaccination [1–8]. The potency of mRNA technology to rapidly provide approved vaccines has recently been demonstrated with anti-SARS-CoV-2 vaccines [9]. These approved mRNA vaccines are formulated as Lipid nanoparticles (LNP), the most clinically advanced mRNA delivery system, to protect mRNA against nucleases and allow intracellular uptake and translation of the mRNA [10–12]. In vivo, mRNA should be delivered to antigen-presenting cells such as dendritic cells (DCs) to induce adaptive protective immune responses [6,10,13].

LNPs are prepared by microfluidic mixing of lipids in ethanol and mRNA in an acidic buffer (pH $\leq$ 4.0) [11]. Lipids include an ionizable lipid (pKa < 7) that will be protonated at acidic pH to condense mRNA and release mRNA inside the cells. This multicomponent system also contains cholesterol for stabilization, a helper lipid for endosomal escape (DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine) or DSPC (distearoylphosphatidylcholine) and a PEGylated (polyethyleneglycol) lipid to prevent aggregation of LNPs. Moreover, several techniques exist for the large scale production of mRNA LNPs [14].

During the endocytosis of nanoparticles (including LNPs), the cell plasma membrane starts to invaginate to entrap nanoparticles inside small vesicles. These vesicles are routed to the early endosome and, subjected to an acidic pH gradient from mildly acid early endosomes (pH 6.3) to late endosomes (pH 5.5) and finally lysosomes (pH < 5) [15–17]. As lysosomes are a degradation compartment, a key parameter for a LNP formulation is to

limit mRNA entrapment in the endosomes (reviewed in [4,10–12]). Indeed, only ≈ 1 –2.5% mRNA was detected in the cytosol after transfection of human epithelial cells with mRNA LNPs made of the ionizable lipid D-Lin-MC3-DMA, which is commonly used for those formulations mRNA LNPs [18,19]. This drastic limiting step led to the development of formulations with different strategies for enhanced intracellular delivery and endosomal escape [12].

Previous studies with mRNA LNPs insisted on the importance of the helper lipid or the cholesterol analog for mRNA transfection [11,20–22]. The flexibility of mRNA, with an exposition of nucleobases leads to electrostatic and hydrophobic interactions with the lipids, similar to single-stranded DNA [23,24]. Structures of mRNA-LNPs have been described by cryo-TEM (Transmission electron cryomicroscopy) and SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) either as lamellar [25] or disordered inverted hexagonal [26]. The influence of lipid composition on LNP structure has been reviewed recently, with a focus on resolved structures [27]. SAXS studies identified distinct locations of lipids in LNPs, with segregation of DSPC at their surface [25]. Moreover, the choice of helper lipid was shown to drastically change LNP tissue tropism after intravenous injection and in vivo mRNA expression due to the binding of distinct proteins in the circulation [28,29]. Concerning the helper lipid, DOPE was shown to yield higher cellular transfection efficiency over the more frequently used DSPC with less inflammation at the injection site [30–33]. This was attributed to the organization of DOPE in the hexagonal phase favorable to membrane fusion [22,34]. The Sahay group revealed higher potency of LNPs prepared with the cholesterol analog β -sitosterol [21,35]. The inclusion of β -sitosterol instead of cholesterol improved mRNA transfection by 48-fold in cancer cells and by 14-fold in primary macrophages.

Such enhancement was attributed to differences in LNPs microstructure and intracellular trafficking.

Studies on helper lipids were carried on by different groups, making side-by-side comparisons difficult. We used a FDA-approved lipid formulation of D-Lin-MC3, cholesterol, DSPC and DMG-PEG at 50:38.5:10:1.5 molar ratios as a benchmark. This formulation is approved as the siRNA therapy ONPATRO[®] [36]. Aiming to present correlations for LNP performance, we compared three types of LNPs containing either DSPC and cholesterol, DOPE and cholesterol or DOPE and β -sitosterol based on their ability to transfect cell lines in culture, their intracellular trafficking patterns in DC, and in vivo expression after intramuscular injection.

2. Materials and Methods

All reagents were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) unless otherwise stated. mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit, was purchased from Thermo Fisher (Montigny-le Bretonneux, France). DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DMG-PEG (1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000), were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), cholesterol and β -Sitosterol (ref 85451) were from Sigma Aldrich (Lyon, France). D-Lin-MC3 was from Clinisciences (Nanterre, France). All primers were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). The structures of these lipids are presented in Figure S1.

2.1. Plasmids

The pGEM4Z-EGFP plasmid containing a T7 promoter for the production of EGFP RNA has been previously described [37,38]. GFP-rab7 WT was a gift from Richard Pagano (Addgene plasmid #12605) [39]. EGFP-Rab11a-7 was a gift from Michael Davidson (Addgene plasmid #56444) [40]. pDNA used in this study was amplified in *E. coli* DH5 α and purified using an Endofree Plasmid Mega Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

2.2. *In Vitro* Transcription of GFP mRNA

Anti-reverse cap analog (ARCA)-capped RNA with a poly(A) tail coding the reporter gene EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) was produced by *in vitro* transcription using the T7 mMessage mMachine kit as in [37,38]. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm; RNA had 260:280 ratios ≥ 2 and was stored at -80°C in small aliquots. The quality of GFP mRNAs was verified by Agilent analysis (Figure S3).

2.3. Cell Culture

DC2.4 murine DC cells were a gift from Kenneth L. Rock [41]. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . DC2.4 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. HEK293 human immortalized cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Cells were mycoplasma-free as evidenced by MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Levallois Perret, France).

2.4. LNP Preparation

LNPs were prepared according to [42,43]. Briefly, D-Lin-MC3-DMA, DSPC, DOPE, cholesterol, and DMG-PEG-lipid were solubilized in ethanol at a molar ratio of 50:10:38.5:1.5, and a nitrogen-to-phosphate ratio of 6. mRNA was dissolved in citrate buffer (50 mM citrate buffer [pH 4.0]). The two components were mixed at a 3:1 volume ratio of mRNA to lipid solution with a 12 mL/min flow rate using an Ignite microfluidic system (Precision Nanosystems, Vancouver, Canada). mRNA-containing samples were diluted 40-fold with PBS (pH 7.4) and concentrated by centrifugation with Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck, Lyon, France) at 4000 g for 30 min at 4°C . The encapsulation efficiency was measured with the Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using a microplate reader.

2.5. LNP Characterization

The size and zeta potential of LNP were determined by DLS using Nano S zetasizer (Malvern) and, a SZ-100 nanoparticle analyzer (Horiba), respectively. LNPs were diluted in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) before DLS and zeta potential measurements. For aggregation studies, the size of LNPs was monitored after incubation at 37°C with PBS containing 7% heat-inactivated fetal bovine serum, as in [38].

2.6. Gel Electrophoresis

LNPs and free mRNA were analyzed on a 1% agarose gel containing Ribogreen (ThermoFisher) at a 1/5000 dilution. 1 μg of mRNA was loaded per lane. Gels were imaged using a GelDocXR⁺ Imager (Biorad, Hercules, CA, USA).

2.7. Transfections and Flow Cytometry

Cells were transfected with either LNP or Lipofectamine Messenger Max (LFM, Thermo Fisher) as commercial standard using 1.7 μL of LFM per μg of mRNA in OptiMEM, at 70–80% confluency in 24-well plates using containing 0.5 μg of RNA encoding EGFP per well. Transfection was performed in complete media. Transfection efficiency was evaluated at 24 h after transfection. The cell-associated fluorescence intensity was measured with a flow cytometer (FACSA X20; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$. The fluorescence intensity was expressed as the mean fluorescence intensity of 10,000 events.

For cellular uptake experiments, LNP were prepared with Cyanine 3-labeled mRNA. mRNA was labeled with Cyanine 3 using Label IT® Nucleic Acid Labeling Reagents (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA), following manufacturer's instructions.

2.8. In Cellulo Cytotoxicity

Cytotoxicity was evaluated performing an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay as in [37]. Briefly, a solution of MTT (5 mg/mL in PBS) was added to the cells in a culture medium, and the cells were incubated for 4 h at 37 °C. Then, the formazan crystals were solubilized with acidic isopropanol and the absorbance was measured at 570 nm with a Victor I spectrophotometer. Cell viability was expressed as a percentage of the absorbance of untransfected cell cultures in the same conditions.

2.9. Analysis of Intracellular Distribution of LNP by Confocal Microscopy

We used confocal microscopy to evaluate the subcellular distribution of mRNA-LNPs using a LSM 980 Airyscan 2 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), based on [44]. DC 2.4 cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates at 120,000 cells per well. Early endosomes were stained by transduction with CellLight® Early Endosomes-GFP baculoviruses expressing the early endosomes protein Rab5a fused to green fluorescent protein (Thermo Fisher Scientific Inc., Yokohama, Japan) following manufacturer's protocol. To label other organelles, cells were transfected with pDNA encoding either EGFP-Rab7 (late endosomes) or EGFP-Rab11 (recycling endosomes). EGFP-Rab pDNA was transfected using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) with 0.5 µg mRNA per well 24 h before incubation with mRNA-LNP complexes. Cells were incubated with complexes prepared with 0.5 µg Cy3-labeled mRNA for 4 h at 37 °C. Then, cells were washed with PBS before fixation in 4% paraformaldehyde and mounted with Fluoromount-G™ Mounting Medium containing DAPI (Thermo Fischer, Waltham, MA USA). Weighted colocalization coefficients between Cy3-labeled mRNA and GFP-labeled organelles were determined using Zen Blue software version 3.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). This calculation considers the intensity values of the summed pixels. The software uses the following equation for Pearson's colocalization coefficient (PCC) calculation:
$$PCC = \frac{\sum (Ch1i - Ch1avg)(Ch2i - Ch2avg)}{\sqrt{(\sum (Ch1i - Ch1avg)^2)(\sum (Ch2i - Ch2avg)^2)}}$$
. The calculation analyses take into account the signal intensities in colocalized and non-colocalized regions.

2.10. In Vivo mRNA Expression

All procedures were approved by the French Ministry of Research (#30279). 7–8 weeks Balb/c mice received 5 µg Cap1-capped and 5-methoxyuridine modified firefly luciferase mRNA (Oz Biosciences, Marseille, France) formulated as LNP. LNP were injected into the tibialis muscle. Animals were imaged at 6 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-injection using an IVIS Lumina system Imaging system (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) 5 min after intraperitoneal injection of 200 µl of the D-Luciferin substrate (Promega, Madison, WI, USA). Luciferase signal was quantified using Living Image software (Perkin Elmer).

2.11. Statistical Analysis

The data were tested for statistical significance using ANOVA. All numerical data are expressed as mean ± SD, $n = 3$. Experiments were performed twice in triplicates. Any p -value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Formation of LNP

Based on previous reports, we prepared LNPs with the following molar ratios: 50% of D-Lin-MC3 ionizable lipid, 10% helper lipid (DSPC or DOPE), 38.5% of sterol (cholesterol or β -sitosterol) and 1.5% PEGylated lipid at an N/P ratio of 6 [9,10,33]. Structures of lipids are presented in Figure S1. This resulted in testing three formulations: MC3/DSPC/Cholesterol/PEG (referred as DSPC/Chol), MC3/DOPE/Cholesterol/PEG (referred as DOPE/Chol), and MC3/DOPE/ β -sitosterol/PEG (referred as DOPE/ β S). β S possesses an additional ethyl group at the C24 position. All formulations resulted in LNPs

of 76–95 nm with a neutral zeta potential (Table 1). Complexation of mRNA was verified by gel electrophoresis, with no free mRNA detectable (Figure 1A). Interestingly, DSPC containing LNPs exhibited a lower polydispersity index (0.066 for MC3/DSPC/Cholesterol/PEG vs. 0.16 for MC3/DOPE/Cholesterol/PEG and 0.13 for MC3/DOPE/ β -sitosterol/PEG). These results indicate similarly low polydispersity for the three types of LNPs. We also monitored the size of LNPs after incubation with serum and at 37 °C by dynamic light scattering (Figure 1B). Proteins in serum could interact with the surface of LNPs and induce their aggregation. The three types of LNPs remained stable during incubation confirming the PEG-mediated stabilization of the nanoparticles in serum as previously reported [38,45,46]. The size of DOPE/ β S LNPs moderately increased from 90 nm to 120 nm over 8 h. This may suggest an evolution (a rearrangement/fusion of LNP) toward larger particles induced by the presence of β S at the LNP surface, as it has been observed for liposomes [47]. Nevertheless, a moderate 20–30 nm size increase of mRNA-LNPs in the presence of serum was also reported by Miao et al. suggesting this will not affect the capacity of DOPE/ β S LNPs to transfect cells [46].

Table 1. Size and zeta potential of LNPs.

Composition	Size (nm)	Polydispersity Index	Zeta Potential (mV)
MC3/DOPE/Chol/PEG	84/13	0.16/0.02	−1.6/2.3
MC3/DSPC/Chol/PEG	76/6	0.066/0.046	4/1.5
MC3/DOPE/ β S/PEG	95/5	0.13/0.1	−0.1/3
Lipofectamine Messenger max	240/46	0.41/0.22	−1.6/3

Abbreviations: Chol, cholesterol; β S, β -sitosterol. $n = 3$, data are presented with standard deviation.

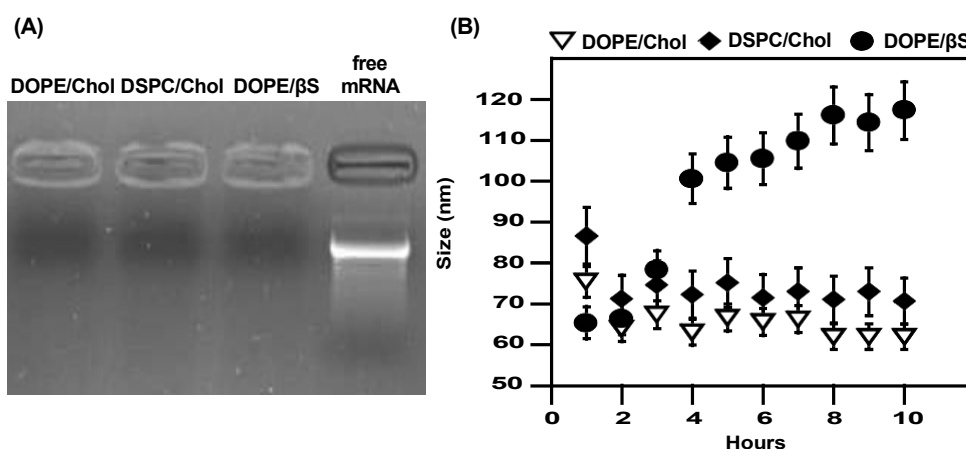


Figure 1. mRNA complexation and stability of mRNA LNPs in serum-containing media. (A), mRNA complexation: Free or LNP-complexed mRNA were run on an agarose gel electrophoresis; (B), Size stability: LNPs were incubated in media containing bovine serum at 37 °C and size was monitored by DLS. DLS measurements are the mean of two experiments.

3.2. Cellular Transfection Efficiency

Next, we compared the transfection efficiency of the three types of LNPs (Figure 2).

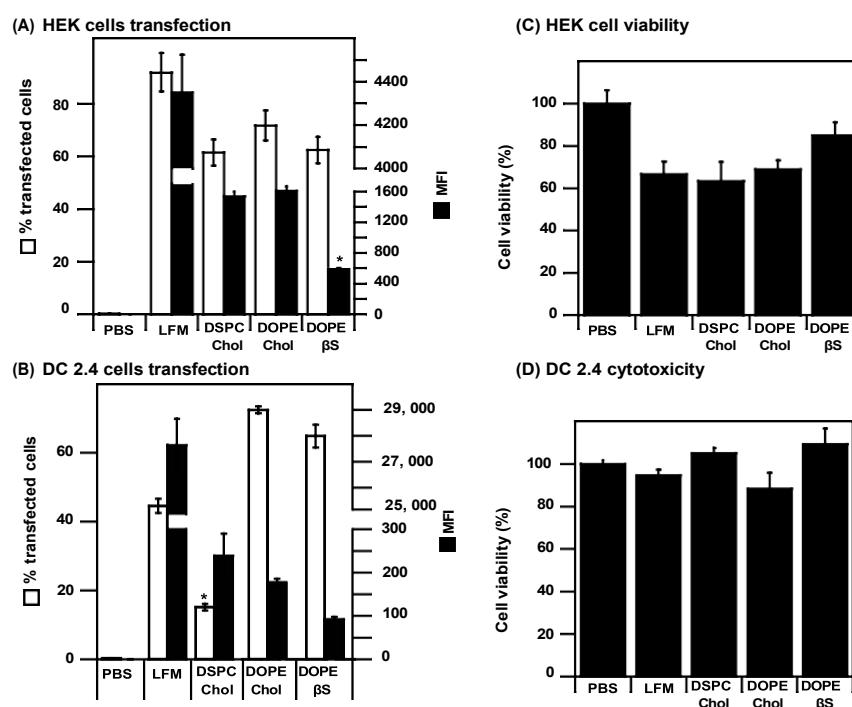


Figure 2. Evaluation of mRNA LNPs transfection efficiency: LNPs prepared with EGFP mRNA were used to transfect HEK cells (A,C) or DC 2.4 cells (B,D). Transfection efficiency and cytotoxicity were measured 24 h after transfection. Data are presented as mean $\pm$ SD of two experiments performed in triplicates, * $p < 0.05$ compared to other LNPs.

As most in cellulo studies on mRNA LNPs use human cancer cell lines or immortalized cells [20,35,48], we also transfected human HEK cells (Figure 2A,C). In these immortalized cells, the three types of LNPs were capable of transfecting more than 60% of cells, albeit lower than the commercial LFM standard (90% transfected cells). Contrary to DCs, lower MFI were detected in HEK cells transfected with DOPE/ β S LNPs (583 MFI) compared to DSPC/Chol LNPs (1539 MFI) and DOPE/Chol LNPs (1607). In HEK cells, their transfection with LFM, DOPE/Chol LNPs, and DSPC/Chol LNPs induced cytotoxicity leading to only 65–70% viable cells after transfection (Figure 2C). Interestingly, DOPE/ β S LNPs were better tolerated with 80% viable cells after transfection.

As our focus is mRNA vaccination, we also evaluated the transfection efficiency of those formulations on the murine DC2.4 DC cell line, [49–51] (Figure 2B,D). The percentage of transfected DC is lower (40–70%) compared to that of HEK cells (60–80%). Lower transfection efficiency in murine dendritic cells was expected as they are notoriously harder to transfect than human cancer or immortalized cells [52,53] but it could also be attributed to the species-dependent cellular response to mRNA LNPs recently reported [54]. Whereas DOPE/Chol and DOPE/ β S LNPs transfected 65–70% DCs—that is more than the commercial standard Lipofectamine Messenger Max[®] (LFM, 45%)—DSPC/Chol LNPs only transfected 15% of DCs. When looking at the mean fluorescence intensity (MFI), correlated with intracellular eGFP copies related to mRNA expression, a striking contrast is observed between LFM (28,000 MFI) and LNPs (90–240 MFI). Better transfection efficiency of DOPE-LNPs over DSPC-LNPs is in agreement with previous optimization experiments made for mRNA LNPs [22,30,33]. Such a gap in MFI, corresponding to a 100-fold difference, suggests different intracellular processing of the two types of complexes in DCs. Note that more than 80% of cells were viable in all groups after transfection indicating a lack of cytotoxicity (Figure 2D).

3.3. Intracellular Trafficking of mRNA in DCs

We deciphered the intracellular fate of the three types of LNPs in DC. To do so, we combined quantitative cellular uptake by flow cytometry and confocal microscopy. The three types of LNPs exhibited a similar cellular internalization with more than 80% cyanin3 mRNA-positive cells after 4 h incubation (Figure 3E), in agreement with previous studies [22,42].

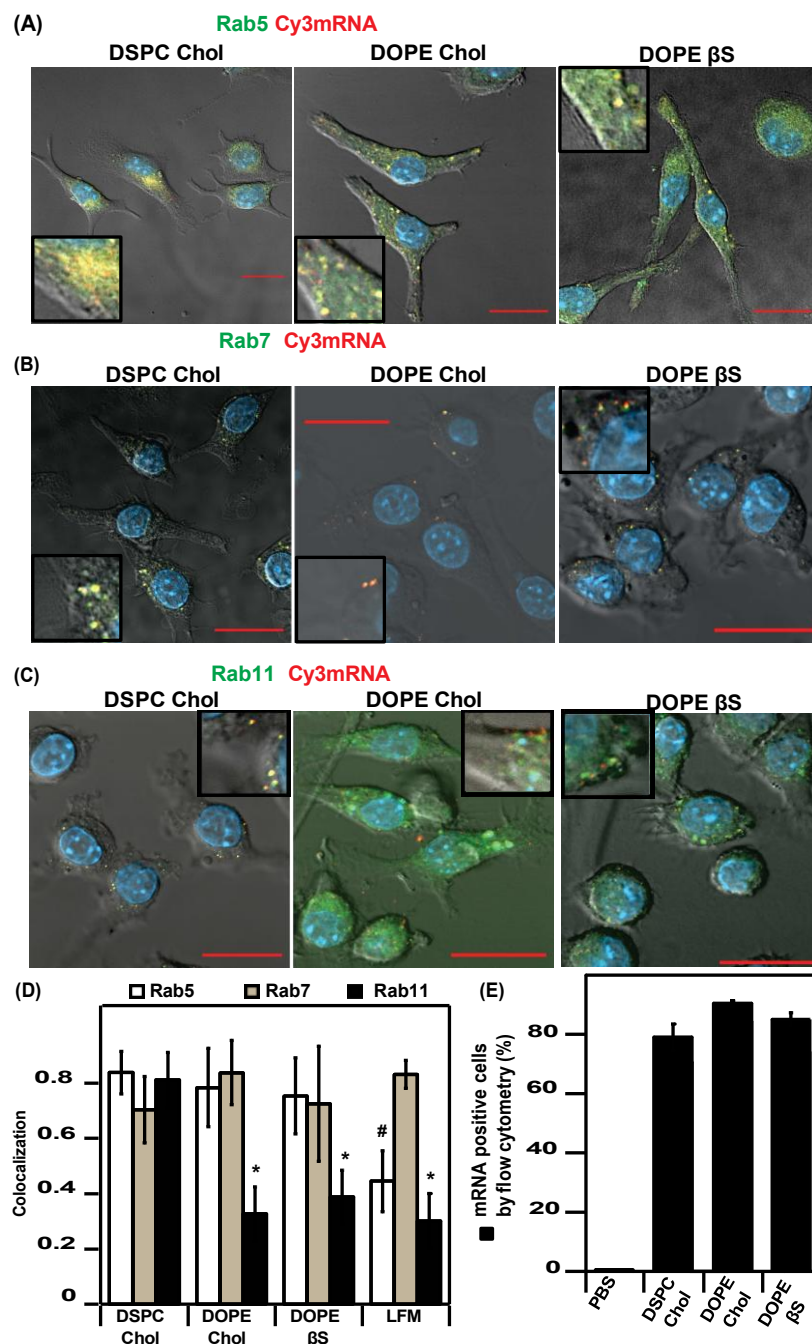


Figure 3. Intracellular trafficking of Cy3 mRNA-LNPs in DC 2.4 cells by confocal microscopy and flow cytometry: (A), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (B), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (C), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (D), Pearson's colocalization coefficient quantification; (E), quantification of Cy3 mRNA-LNPs uptake in DC 2. cells by flow cytometry. Nuclei were stained with DAPI. Bar represents 20 μ m. Data are presented as mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$ compared to DSPC/Chol LNPs., # $p < 0.05$ compared to all LNPs. Zoomed areas are shown in inserts.

We further investigated the intracellular trafficking of Cy3-labeled mRNA using confocal microscopy and cells expressing chimera fluorescent proteins to label critical organelles: EGFP-Rab5, EGFP-Rab7, and EGFP-Rab11 to label early endosomes, late endosomes, and recycling endosomes, respectively (Figure 3A–C and Figure S2) [16,55–57]. Endosomal trafficking was studied 4 h after transfection as in the original report comparing cholesterol and β -sitosterol LNPs [21]. A summary of Pearson's colocalization coefficient (PCC) data is presented in Figure 3D, representative confocal pictures for each condition are presented in Figure 3A–C. The three types of LNPs exhibited high retention in early endosomes, with PCCs of 0.7–0.8. By contrast, LFM had a markedly decreased retention in early endosomes (PCC of 0.44) suggesting a faster intracellular routing (Figure S2).

Interesting to note that the percentage of transfected cells by DOPE/Chol and DOPE/ β S formulations is higher than that of LFM. By contrast, the translation efficiency reflected by the MFI values (Figure 2) of cells transfected with LFM is at least 100-fold more than those obtained with other LNPs. Therefore, it is tempting to suggest that the low retention of LFM formulations in early endosomes could be due to a better endosomal escape of LFM-delivered mRNA leading to the higher mRNA expression with LFM in DCs.

The three types of LNPs and LFM resulted in a similar mRNA distribution in late endosomes. Such a lack of difference in Rab7-compartments trafficking of nanoparticles with different transfection efficiency agrees with a previous study on LNP intracellular trafficking indicating a lack of predictive value of late endosome distribution [58]. Furthermore, the indistinguishable endosomal distribution profiles of cholesterol and β -sitosterol LNPs are in agreement with a previous report [21].

We also imaged the distribution of mRNA in Rab11 recycling endosomes which play a key role in routing to exocytosis or lysosomes [59–61]. LFM, DOPE/Chol, and DOPE/ β S which are the most efficient formulations in DC2.4 cells in terms of percentage of transfected cells had a comparably low distribution in Rab11 compartments with PCCs between 0.3 and 0.4. On the contrary, DSPC/Chol LNPs which transfected less than 20% DC2.4 were highly localized in recycling endosomes (PCC or 0.81). This observation suggests that those particles could be exocytosed explaining the low transfection efficiency. Such an inverse correlation between Rab11 accumulation and transfection efficiency in dendritic cells is consistent with results on DNA lipoplexes in human cancer cells [62].

Last, the difference in transfection efficiency cannot be due to the difference in endocytosis. Indeed, the intracellular quantification of Cy3-mRNA delivered with the different formulations revealed that all formulations are similarly up taken by the DC2.4 cells.

3.4. *In Vivo* Expression of mRNA

We next tested the expression of mRNA LNPs in mice. We chose the intramuscular route as it allows a maximal localized mRNA expression and it was the route used for the approved mRNA vaccines [9–11,53]. To the best of our knowledge, no study compared DSPC/Chol, DOPE/Chol, and DOPE/ β S LNPs *in vivo*. We compared three doses of mRNA: 1 μ g, 2 μ g and 5 μ g mRNA as low, intermediate, and high dose, respectively (Figure 4). Noteworthy, when the lowest dose of mRNA-LNPs was injected (Figure 4, mouse's left paws), DOPE/ β S LNPs achieved superior luciferase expression over DOPE/Chol and DSPC/Chol LNPs at 24 h (6.7 and 6-fold, respectively).

When formulated with 2 μ g mRNA (Figure 4, mouse's right paws), DOPE/ β S and DOPE/Chol NPs resulted in similar expression from 6 h to 72 h. Whilst DSPC/Chol LNPs were inferior with a five-fold higher luciferase signal compared to DOPE/ β S and DOPE/Chol NPs. Following the same tendency, injection of 5 μ g mRNA (Figure 4B) produced a similar signal with DOPE/ β S and DOPE/Chol LNPs at 6 h, 48 h, and 72 h. At 24 h post-injection, DOPE/ β S LNPs resulted in the brightest luminescence: three-fold over DOPE/Chol LNPs and DSPC/Chol LNPs. DSPC/Chol group showed the lowest luciferase signal at 6 h and 24 h confirming the results obtained with 1 μ g and 2 μ g mRNA doses.

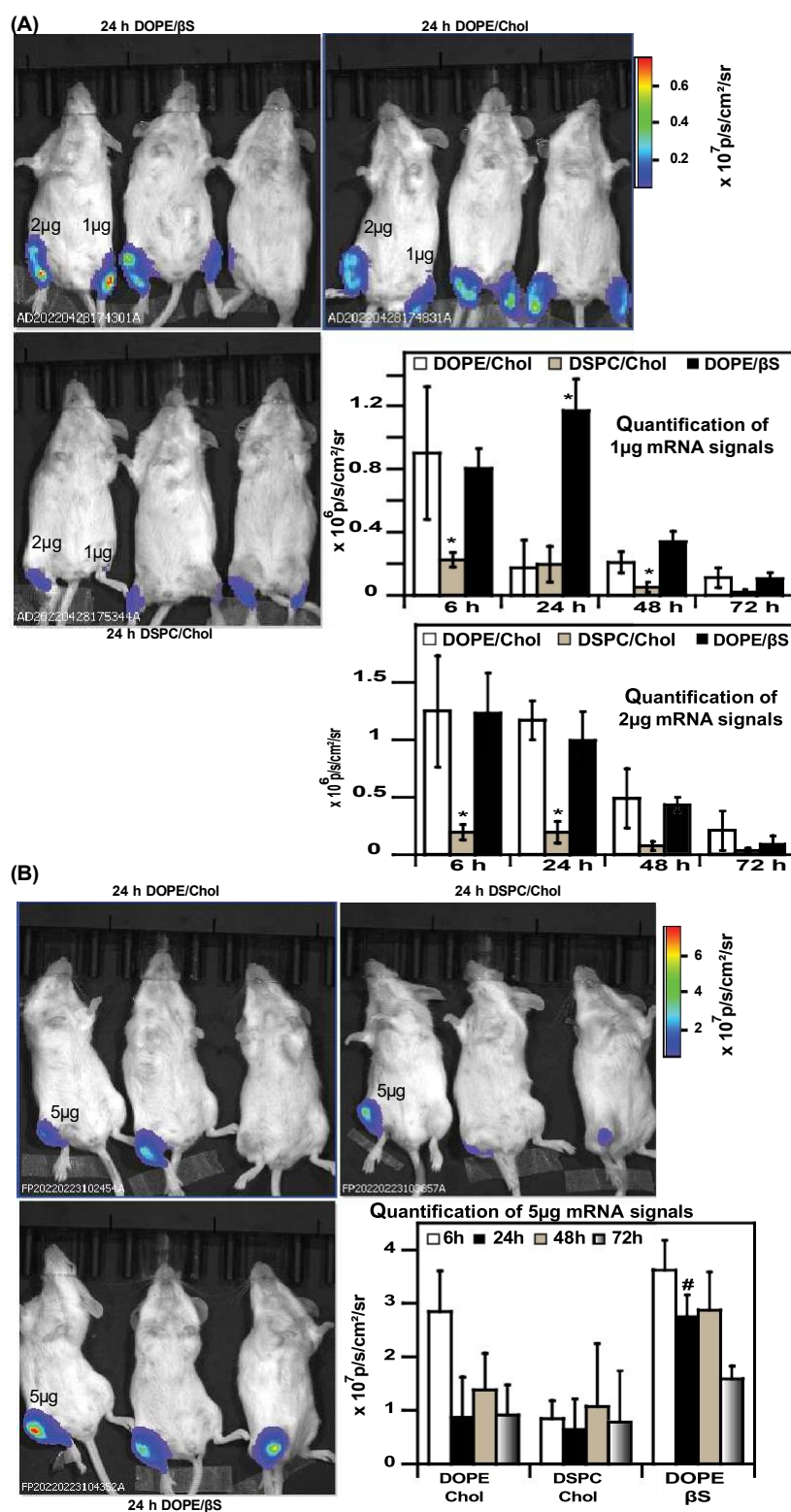


Figure 4. Evaluation of mRNA LNPs in vivo expression: (A), representative images of luciferase expression 24 h after intramuscular injection of 1 μ g or 2 μ g mRNA-LNPs, signal was during 3 days ($n = 3$); (B), representative images of luciferase expression 24 h after intramuscular injection of 5 μ g mRNA-LNPs, signal was during 3 days ($n = 3$). Data are presented as mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$ compared to DOPE/Chol LNPs and DOPE/ β S LNPs, # $p < 0.05$ compared to DOPE/Chol and DSPC/Chol LNPs.

We must point out that studies comparing DOPE and DSPC co-lipids in mRNA LNPs have been performed with intravenous or subcutaneous injection routes rather than intramuscular routes [22,30,33]. Our experiments confirmed the previous studies with the benefit of DOPE and β S combination for in vivo mRNA delivery, particularly evident at 1 μ g and 5 μ g doses of mRNA. In accordance with our study, Alvarez-Benedicto et al. reported better expression of luciferase in the spleen and liver of luciferase after intravenous injection in mice of mRNA LNPs containing DOPE over DSPC [22].

Our results of better efficacy of DOPE-containing LNPs over DSPC-containing LNPs might be explained by differences in corona formation and cell interaction with DSPC and DOPE-LNPs for each route. Yet, complementary studies will be required to decipher the impact of cholesterol, β -sitosterol and DOPE on the structure of LNPs. Such multiscale analyses including cryo-TEM and SAXS will connect LNP structure and lipid location with LNP activity in cellular models and in vivo. Oberli et al. evidenced as well an induction of inflammation at the injection site after subcutaneous injection of DSPC-LNPs in 20% of mice and 0% of mice with DOPE-LNPs suggesting an impact of the helper lipid on immune cell activation/recruitment in vivo [33]. The findings reported are in accordance with those of Hattori et al. on sterol derivatives for siRNA delivery in murine cancer cells and mice lungs [63]. They compared the silencing activities of lipoplexes made of DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) and four different sterol derivatives: cholesterol, stigmasterol, ergosterol, and β S. DOTAP-based lipoplexes moderately inhibited gene expression irrespective of the sterol derivative in murine cancer cells. They noted similar gene knockdown in the liver 48 h after intravenous injection of 20 μ g siRNA – reflecting a high dose of RNA- delivered by cholesterol or β S liposomes, corroborating the comparable luciferase expression we observed after intramuscular injection of 5 μ g cholesterol or β S mRNA LNPs at 48 h.

4. Conclusions

We present here the first study comparing both DOPE or DPSC and cholesterol or β -sitosterol for mRNA delivery in cellulo and in vivo.

Previous experiments comparing β -sitosterol and cholesterol were performed in HEK293 human cells only and no data in immune cells nor in vivo have been reported yet. They reported a 20-fold higher expression of mRNA after transfection with β -sitosterol LNPs over cholesterol LNPs in HEK293 cells. However, using EGFP mRNA as a reporter, we observed similar percentages of transfected cells with LNPs prepared with cholesterol or its analog in HEK cells and murine dendritic cells. The levels of cell-associated fluorescence were even lower for β -sitosterol LNPs compared to cholesterol LNPs suggesting a difference in translation activity in both cell lines. The benefit of DOPE and β S was more evident in vivo and particularly at the lower mRNA dose of 1 μ g mRNA with higher reporter mRNA expression at 24 h.

Altogether this study provides valuable information for helper lipid choice for dendritic cell transfection and intramuscular administration of mRNA-LNPs vaccines.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano12142446/s1>, Figure S1: Structures of the lipids used in this study; Figure S2. Intracellular trafficking of Cy3 mRNA-LFM complexes in DC 2.4 cells by confocal microscopy with either Rab5-GFP, Rab7-GFP or Rab11-GFP, Figure S3: Agilent analysis of the GFP mRNA produced by in vitro transcription.

Author Contributions: Conceptualization, F.P.; methodology, A.M., A.N.-L., F.P.; writing and review, all authors; funding acquisition, F.P., J.H. and C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by a Ligue Nationale Contre le Cancer Fellowship and a Region Centre-Val de Loire PhD fellowship.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the French Ministry of Research (protocol number APAFIS #30279-2021020511042113 v6 approved on 11/23/2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to Bertrand Castaing and Franck Coste for providing access to the Nano S zetasizer. The authors greatly acknowledge David Gosset of P@CYFIC platform facility, in the Center for Molecular Biophysics for assistance with confocal imaging and the Echoptics platform of CBM for assistance with IVIS imaging.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Bahl, K.; Senn, J.J.; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, L.A.; Hassett, K.J.; Laska, M.E.; Smith, M.; Almarsson, Ö.; Thompson, J. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1316–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Heesch, S.; Bukur, V.; Buck, J.; Diekmann, J.; Diken, M.; Ewen, K.; Haas, H.; Kemmer-Brueck, A.; Kloke, B.-P.; Kreiter, S. Abstract CT020: MERIT: Introducing individualized cancer vaccines for the treatment of TNBC—a phase I trial. *Cancer Res.* **2016**, *76*, CT020. [[CrossRef](#)]
3. Jabulowsky, R.A.; Loquai, C.; Diken, M.; Kranz, L.M.; Haas, H.; Attig, S.; Bidmon, N.; Buck, J.; Derhovanessian, E.; Diekmann, J. Abstract CT032: A first-in-human phase I/II clinical trial assessing novel mRNA-lipoplex nanoparticles for potent cancer immunotherapy in patients with malignant melanoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, CT032. [[CrossRef](#)]
4. Kaczmarek, J.C.; Kowalski, P.S.; Anderson, D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. *Genome Med.* **2017**, *9*, 60. [[CrossRef](#)]
5. Kranz, L.M.; Diken, M.; Haas, H.; Kreiter, S.; Loquai, C.; Reuter, K.C.; Meng, M.; Fritz, D.; Vascotto, F.; Hefesha, H. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **2016**, *534*, 396–401. [[CrossRef](#)]
6. Pardi, N.; Hogan, M.J.; Porter, F.W.; Weissman, D. mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 261–279. [[CrossRef](#)]
7. Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.-P.; Simon, P.; Löwer, M.; Bukur, V.; Tadmor, A.D.; Luxemburger, U.; Schrörs, B. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **2017**, *547*, 222–226. [[CrossRef](#)]
8. Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759–780. [[CrossRef](#)]
9. Verbeke, R.; Lentacker, I.; De Smedt, S.C.; Dewitte, H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J. Control. Release* **2021**, *333*, 511–520. [[CrossRef](#)]
10. Kim, J.; Eygeris, Y.; Gupta, M.; Sahay, G. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *170*, 83–112. [[CrossRef](#)]
11. Uchida, S.; Perche, F.; Pichon, C.; Cabral, H. Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery. *Mol. Pharm.* **2020**, *17*, 3654–3684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Delehedde, C.; Even, L.; Midoux, P.; Pichon, C.; Perche, F. Intracellular Routing and Recognition of Lipid-Based mRNA Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lazzaro, S.; Giovani, C.; Mangiavacchi, S.; Magini, D.; Maione, D.; Baudner, B.; Geall, A.J.; De Gregorio, E.; D’Oro, U.; Buonsanti, C. CD 8 T-cell priming upon mRNA vaccination is restricted to bone-marrow-derived antigen-presenting cells and may involve antigen transfer from myocytes. *Immunology* **2015**, *146*, 312–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Evers, M.J.; Kulkarni, J.A.; van der Meel, R.; Cullis, P.R.; Vader, P.; Schiffelers, R.M. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* **2018**, *2*, 1700375. [[CrossRef](#)]
15. Casey, J.R.; Grinstein, S.; Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50–61. [[CrossRef](#)]
16. Doherty, G.J.; McMahon, H.T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857–902. [[CrossRef](#)]
17. Xu, E.; Saltzman, W.M.; Piotrowski-Daspiet, A.S. Escaping the endosome: Assessing cellular trafficking mechanisms of non-viral vehicles. *J. Control. Release* **2021**, *335*, 465–480. [[CrossRef](#)]
18. Maugeri, M.; Nawaz, M.; Papadimitriou, A.; Angerfors, A.; Camponeschi, A.; Na, M.; Hölttä, M.; Skantze, P.; Johansson, S.; Sundqvist, M. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4333. [[CrossRef](#)]
19. Sabnis, S.; Kumarasinghe, E.S.; Salerno, T.; Mihai, C.; Ketova, T.; Senn, J.J.; Lynn, A.; Bulychev, A.; McFadyen, I.; Chan, J. A novel amino lipid series for mRNA delivery: Improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates. *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 1509–1519. [[CrossRef](#)]
20. Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D.W.; Shi, Y.; Gaensler, K.M.; Tan, X.; Dunn, A.L.; Kerlin, B.A. An orthogonal array optimization of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery in vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107. [[CrossRef](#)]

21. Patel, S.; Ashwanikumar, N.; Robinson, E.; Xia, Y.; Mihai, C.; Griffith, J.P.; Hou, S.; Esposito, A.A.; Ketova, T.; Welscher, K. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Álvarez-Benedicto, E.; Farbiak, L.; Ramírez, M.M.; Wang, X.; Johnson, L.T.; Mian, O.; Guerrero, E.D.; Siegwart, D.J. Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). *Biomater. Sci.* **2022**, *10*, 549–559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Liu, X.; Abbott, N.L. Characterization of the nanostructure of complexes formed by single-or double-stranded oligonucleotides with a cationic surfactant. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15554–15564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Cuomo, F.; Mosca, M.; Murgia, S.; Avino, P.; Ceglie, A.; Lopez, F. Evidence for the role of hydrophobic forces on the interactions of nucleotide-monophosphates with cationic liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *410*, 146–151. [\[CrossRef\]](#)
25. Kulkarni, J.A.; Darjuan, M.M.; Mercer, J.E.; Chen, S.; Van Der Meel, R.; Thewalt, J.L.; Tam, Y.Y.C.; Cullis, P.R. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4787–4795. [\[CrossRef\]](#)
26. Yanez Arteta, M.; Kjellman, T.; Bartesaghi, S.; Wallin, S.; Wu, X.; Kvist, A.J.; Dabkowska, A.; Székely, N.; Radulescu, A.; Bergenholtz, J. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E3351–E3360. [\[CrossRef\]](#)
27. Gaspar, R.; Coelho, F.; Silva, B.F. Lipid-nucleic acid complexes: Physicochemical aspects and prospects for cancer treatment. *Molecules* **2020**, *25*, 5006. [\[CrossRef\]](#)
28. Cheng, Q.; Wei, T.; Farbiak, L.; Johnson, L.T.; Dilliard, S.A.; Siegwart, D.J. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 313–320. [\[CrossRef\]](#)
29. Dilliard, S.A.; Cheng, Q.; Siegwart, D.J. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2109256118. [\[CrossRef\]](#)
30. Kauffman, K.J.; Dorkin, J.R.; Yang, J.H.; Heartlein, M.W.; DeRosa, F.; Mir, F.F.; Fenton, O.S.; Anderson, D.G. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7300–7306. [\[CrossRef\]](#)
31. Kulkarni, J.A.; Witzigmann, D.; Leung, J.; van der Meel, R.; Zaifman, J.; Darjuan, M.M.; Grisch-Chan, H.M.; Thöny, B.; Tam, Y.Y.C.; Cullis, P.R. Fusion-dependent formation of lipid nanoparticles containing macromolecular payloads. *Nanoscale* **2019**, *11*, 9023–9031. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Miao, L.; Li, L.; Huang, Y.; Delcassian, D.; Chahal, J.; Han, J.; Shi, Y.; Sadtler, K.; Gao, W.; Lin, J. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 1174–1185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Oberli, M.A.; Reichmuth, A.M.; Dorkin, J.R.; Mitchell, M.J.; Fenton, O.S.; Jaklenec, A.; Anderson, D.G.; Langer, R.; Blankschtein, D. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent cancer immunotherapy. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 1326–1335. [\[CrossRef\]](#)
34. Orsi, M.; Essex, J.W. Physical properties of mixed bilayers containing lamellar and nonlamellar lipids: Insights from coarse-grain molecular dynamics simulations. *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 249–272. [\[CrossRef\]](#)
35. Eygeris, Y.; Patel, S.; Jozic, A.; Sahay, G. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery. *Nano Lett.* **2020**, *20*, 4543–4549. [\[CrossRef\]](#)
36. Adams, D.; Gonzalez-Duarte, A.; O’Riordan, W.D.; Yang, C.-C.; Ueda, M.; Kristen, A.V.; Tournev, I.; Schmidt, H.H.; Coelho, T.; Berk, J.L. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 11–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Perche, F.; Benvegna, T.; Berchel, M.; Lebegue, L.; Pichon, C.; Jaffrès, P.-A.; Midoux, P. Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 445–453. [\[CrossRef\]](#)
38. Perche, F.; Clemençon, R.; Schulze, K.; Ebensen, T.; Guzmán, C.A.; Pichon, C. Neutral Lipopolyplexes for In Vivo Delivery of Conventional and Replicative RNA Vaccine. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* **2019**, *17*, 767–775. [\[CrossRef\]](#)
39. Choudhury, A.; Dominguez, M.; Puri, V.; Sharma, D.K.; Narita, K.; Wheatley, C.L.; Marks, D.L.; Pagano, R.E. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 1541–1550. [\[CrossRef\]](#)
40. Fang, Z.; Takizawa, N.; Wilson, K.A.; Smith, T.C.; Delprato, A.; Davidson, M.W.; Lambright, D.G.; Luna, E.J. The membrane-associated protein, supervillin, accelerates F-actin-dependent rapid integrin recycling and cell motility. *Traffic* **2010**, *11*, 782–799. [\[CrossRef\]](#)
41. Shen, Z.; Reznikoff, G.; Dranoff, G.; Rock, K.L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 2723–2730. [\[PubMed\]](#)
42. Herrera, M.; Kim, J.; Eygeris, Y.; Jozic, A.; Sahay, G. Illuminating endosomal escape of polymorphic lipid nanoparticles that boost mRNA delivery. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 4289–4300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Zhang, M.; Sun, J.; Li, M.; Jin, X. Modified mRNA-LNP vaccines confer protection against experimental DENV-2 infection in mice. *Mol. Ther.-Methods Clin. Dev.* **2020**, *18*, 702–712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Perche, F.; Yi, Y.; Hespel, L.; Mi, P.; Dirisala, A.; Cabral, H.; Miyata, K.; Kataoka, K. Hydroxychloroquine-conjugated gold nanoparticles for improved siRNA activity. *Biomaterials* **2016**, *90*, 62–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Zhu, L.; Wang, T.; Perche, F.; Taigind, A.; Torchilin, V.P. Enhanced anticancer activity of nanopreparation containing an MMP2-sensitive PEG-drug conjugate and cell-penetrating moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17047–17052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Miao, L.; Lin, J.; Huang, Y.; Li, L.; Delcassian, D.; Ge, Y.; Shi, Y.; Anderson, D.G. Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–13. [[CrossRef](#)]
47. Song, F.; Chen, J.; Zheng, A.; Tian, S. Effect of sterols on liposomes: Membrane characteristics and physicochemical changes during storage. *LWT* **2022**, *164*, 113558. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, N.-N.; Li, X.-F.; Deng, Y.-Q.; Zhao, H.; Huang, Y.-J.; Yang, G.; Huang, W.-J.; Gao, P.; Zhou, C.; Zhang, R.-R. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. *Cell* **2020**, *182*, 1271–1283.e16. [[CrossRef](#)]
49. Haabeth, O.A.; Blake, T.R.; McKinlay, C.J.; Waymouth, R.M.; Wender, P.A.; Levy, R. mRNA vaccination with charge-altering releasable transporters elicits human T cell responses and cures established tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E9153–E9161. [[CrossRef](#)]
50. Yang, R.; Deng, Y.; Huang, B.; Huang, L.; Lin, A.; Li, Y.; Wang, W.; Liu, J.; Lu, S.; Zhan, Z. A core-shell structured COVID-19 mRNA vaccine with favorable biodistribution pattern and promising immunity. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 213. [[CrossRef](#)]
51. Zhang, H.; You, X.; Wang, X.; Cui, L.; Wang, Z.; Xu, F.; Li, M.; Yang, Z.; Liu, J.; Huang, P. Delivery of mRNA vaccine with a lipid-like material potentiates antitumor efficacy through Toll-like receptor 4 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2005191118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chahal, J.S.; Khan, O.F.; Cooper, C.L.; McPartlan, J.S.; Tsosie, J.K.; Tilley, L.D.; Sidik, S.M.; Lourido, S.; Langer, R.; Bavari, S. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E4133–E4142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Li, L.; Long, J.; Sang, Y.; Wang, X.; Zhou, X.; Pan, Y.; Cao, Y.; Huang, H.; Yang, Z.; Yang, J. Rational preparation and application of a mRNA delivery system with cytidinyl/cationic lipid. *J. Control. Release* **2021**, *340*, 114–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hatit, M.Z.; Lokugamage, M.P.; Dobrowolski, C.N.; Paunovska, K.; Ni, H.; Zhao, K.; Vanover, D.; Beyersdorf, J.; Peck, H.E.; Loughrey, D. Species-dependent in vivo mRNA delivery and cellular responses to nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2022**, *17*, 310–318. [[CrossRef](#)]
55. El-Sayed, A.; Harashima, H. Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1118–1130. [[CrossRef](#)]
56. Ramel, D.; Wang, X.; Laflamme, C.; Montell, D.J.; Emery, G. Rab11 regulates cell–cell communication during collective cell movements. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 317–324. [[CrossRef](#)]
57. Song, Y.; Wu, Y.; Xu, L.; Jiang, T.; Tang, C.; Yin, C. Caveolae-Mediated Endocytosis Drives Robust siRNA Delivery of Polymeric Nanoparticles to Macrophages. *ACS Nano* **2021**, *15*, 8267–8282. [[CrossRef](#)]
58. Paramasivam, P.; Franke, C.; Stöter, M.; Höijer, A.; Bartesaghi, S.; Sabirsh, A.; Lindfors, L.; Arteta, M.Y.; Dahlén, A.; Bak, A. Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale. *J. Cell Biol.* **2021**, *221*, e202110137. [[CrossRef](#)]
59. Takahashi, S.; Kubo, K.; Waguri, S.; Yabashi, A.; Shin, H.-W.; Katoh, Y.; Nakayama, K. Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 4049–4057. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, J.; Chang, D.; Yang, Y.; Zhang, X.; Tao, W.; Jiang, L.; Liang, X.; Tsai, H.; Huang, L.; Mei, L. Systematic investigation on the intracellular trafficking network of polymeric nanoparticles. *Nanoscale* **2017**, *9*, 3269–3282. [[CrossRef](#)]
61. Zhang, J.; Zhang, X.; Liu, G.; Chang, D.; Liang, X.; Zhu, X.; Tao, W.; Mei, L. Intracellular trafficking network of protein nanocapsules: Endocytosis, exocytosis and autophagy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2099–2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Majzoub, R.N.; Wonder, E.; Ewert, K.K.; Kotamraju, V.R.; Teesalu, T.; Safinya, C.R. Rab11 and lysotracker markers reveal correlation between endosomal pathways and transfection efficiency of surface-functionalized cationic liposome–DNA nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 6439–6453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hattori, Y.; Saito, H.; Oku, T.; Ozaki, K.-I. Effects of sterol derivatives in cationic liposomes on biodistribution and gene-knockdown in the lungs of mice systemically injected with siRNA lipoplexes. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *24*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Information for

In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA

Ayoub Medjmedj 1,†, Albert Ngalle-Loth 1,†, Rudy Clemençon 1, Josef Hamacek 1,2, Chantal Pichon 1,2 and Federico Perche 1,*

¹ Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France; ayoub.medjmedj@cnrs-orleans.fr (A.M.); albert.ngalle-loth@cnrs-orleans.fr (A.N.-L.); rudy.clemencon@cnrs.fr (R.C.); josef.hamacek@cnrs.fr (J.H.); pichon@cnrs.fr (C.P.)

² Centre de Biophysique Moléculaire, University of Orléans, 45100 Orléans, France

* Correspondence: federico.perche@cnrs-orleans.fr; Tel.: +33-2-38-25-55-44

† These authors contributed equally to this work.

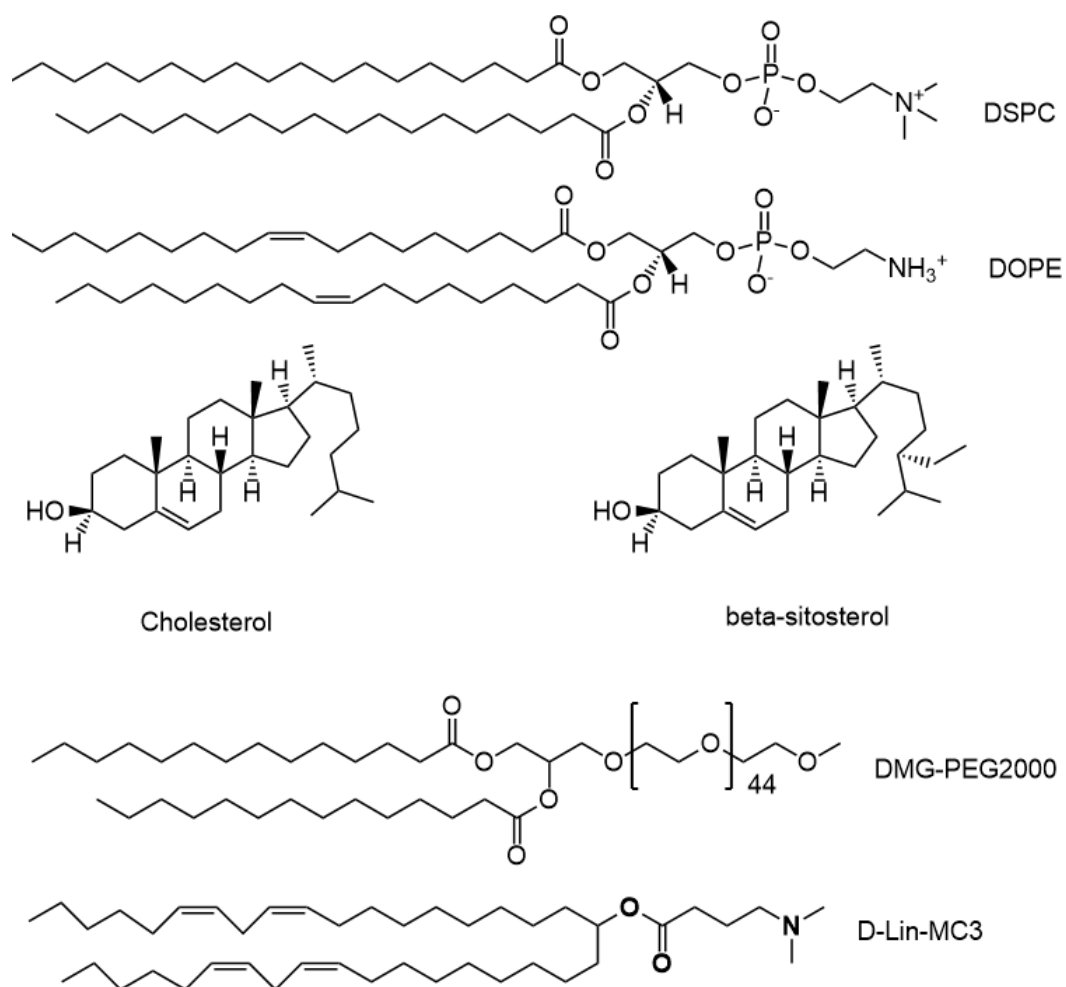


Figure S1. Structures of the lipids used in this study.

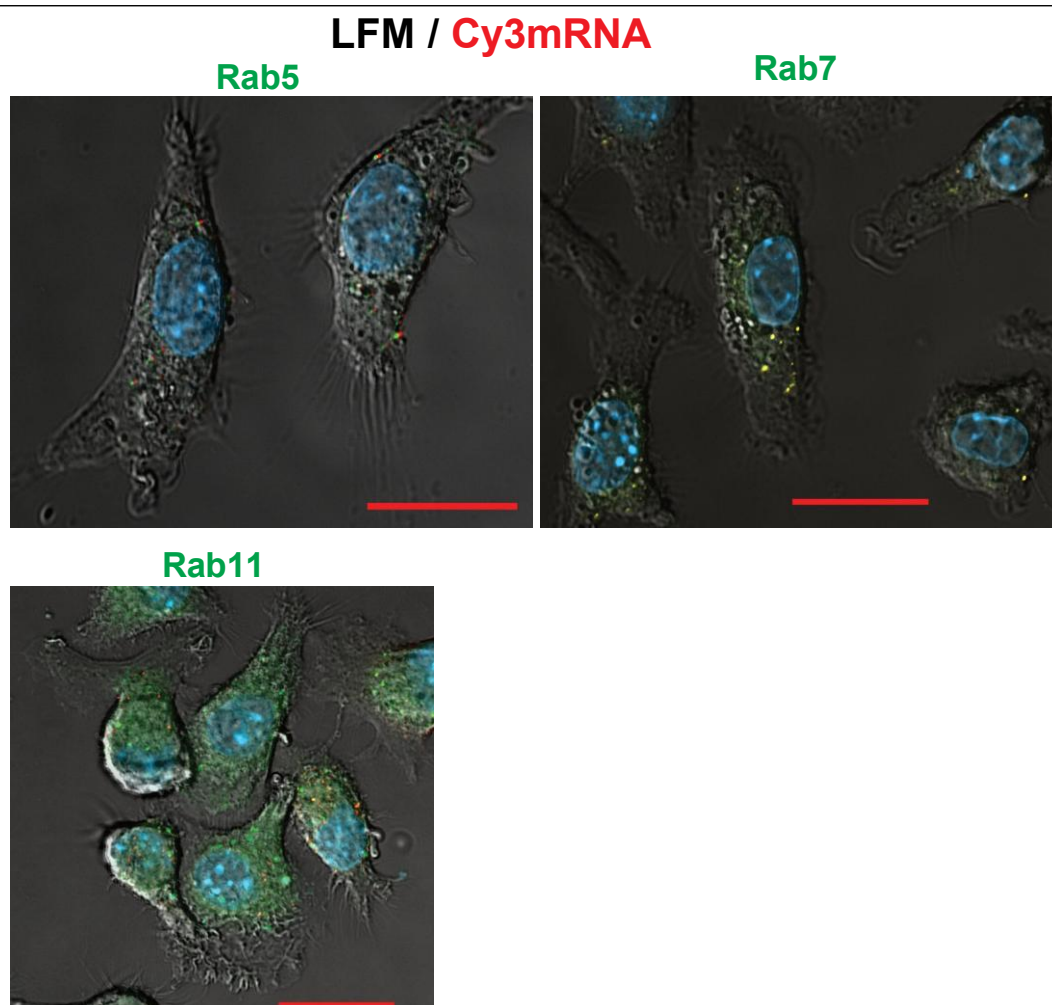


Figure S2. Intracellular trafficking of Cy3 mRNA-LFM complexes in DC 2.4 cells by confocal microscopy with either Rab5-GFP, Rab7-GFP or Rab11-GFP. Nuclei were stained with DAPI. Bar represents 20 μ m.

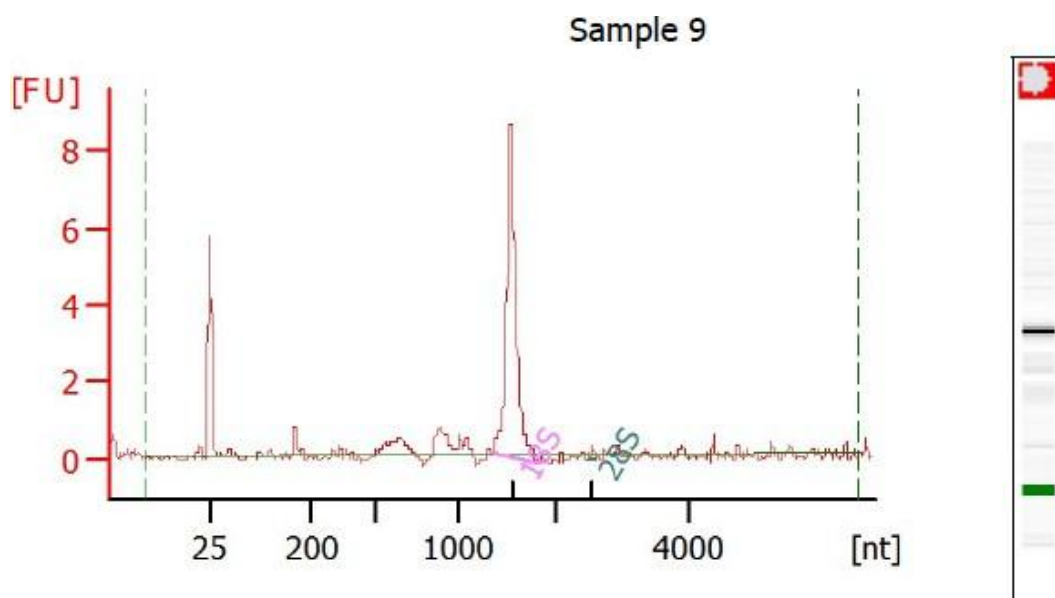


Figure S3. Agilent analysis of the GFP mRNA produced by *in vitro* transcription.

L'objectif était d'identifier la meilleure formulation pour la délivrance d'un ARNm thérapeutique conçu pour la délivrance in vivo. Cette formulation est celle à base de DOPE et β -sitostérol. Nos résultats ont montré que les LNP formulés avec le DOPE induisaient une meilleure expression des gènes rapporteurs in cellulo et in vivo. De plus, in vivo la combinaison de DOPE et β -sitostérol a induit les meilleures expressions des ARNm administrés.

En conclusion, cet article démontre l'intérêt du choix des lipides auxiliaires pour la transfection des cellules dendritiques et l'administration d'ARNm par voie intramusculaire. De plus, il renforce l'importance d'étudier le trafic intracellulaire, qui permet de mieux comprendre les efficacités de transfection obtenues.

CHAPITRE 5 : Formulation des ARNm thérapeutiques : du Lip100 au LYX

Dans l'étude suivante, nous nous sommes intéressés à la formulation d'ARNm thérapeutique pour la signalisation ostéogénique. Dans ce cadre, la production des ARNm d'intérêt, codant les facteurs ostéoinducteurs était un prérequis. La section suivante décrit la synthèse de ces ARNm, la diminution de leur immunogénicité et leur formulation. Enfin, ce chapitre s'intéresse aussi à l'optimisation du système de délivrance.

5.1. Optimisation de l'expression des ARNm : stratégies et approches

5.1.1. Stratégies d'amélioration de l'expression des ARNm produits par IVT

Comme nous l'avons vu précédemment, pour surmonter l'immunogénicité de l'ARNm, plusieurs stratégies peuvent être employées. Pour ce faire, deux études utilisant de l'ARNm codant pour la protéine BMP-2 ont été choisies comme modèles.

D'une part, une étude antérieure menée dans l'équipe, a démontré le potentiel de l'ARNm NS1 (non-structural protein 1) combiné à l'ARNm BMP-2 pour améliorer son expression (P. Wang et al. 2020).

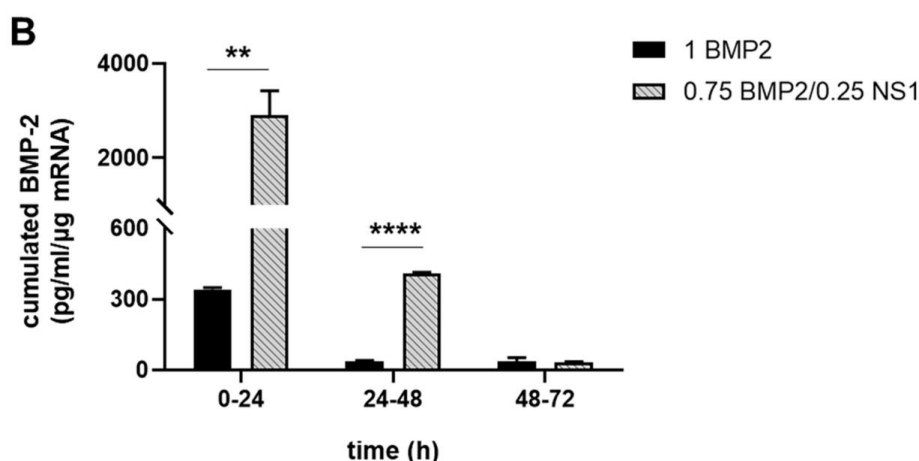


Figure 47 : Amélioration de la traduction des ARNm BMP-2 co-délivré avec l'ARNm NS1 (P. Wang et al. 2020).

La figure 47 montre la quantification de la protéine BMP-2 produite (par dosage ELISA) par des cellules pluripotentes C3H10T1/2 transfectées par de l'ARNm BMP-2 ou de l'ARNm

BMP-2 et NS1. Les résultats de ces travaux montrent que l'utilisation de l'ARNm NS1 favorise l'expression de l'ARNm d'intérêt en diminuant son immunogénicité (figure 15).

Pour ces raisons l'utilisation de l'ARNm NS1 fut considérée pour améliorer l'expression de nos ARNm.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux nucléotides modifiés, où l'on retrouve principalement dans les RAM la s2U (2-thiouridine), la m5C (5-méthylcytidine) et la Ψ (pseudouridine). Dans le cadre de la régénération osseuse, les travaux les plus aboutis, utilisent des analogues d'iodo-nucléotides (5iU et 5iC) pour améliorer l'efficacité de traduction de leurs ARNm. C'est le cas de l'étude suivante (figure 48), dans laquelle les auteurs induisent la réparation d'un défaut de taille critique (5,0 mm) chez le rat grâce à l'administration de ces ARNm modifiés (De La Vega et al. 2022).

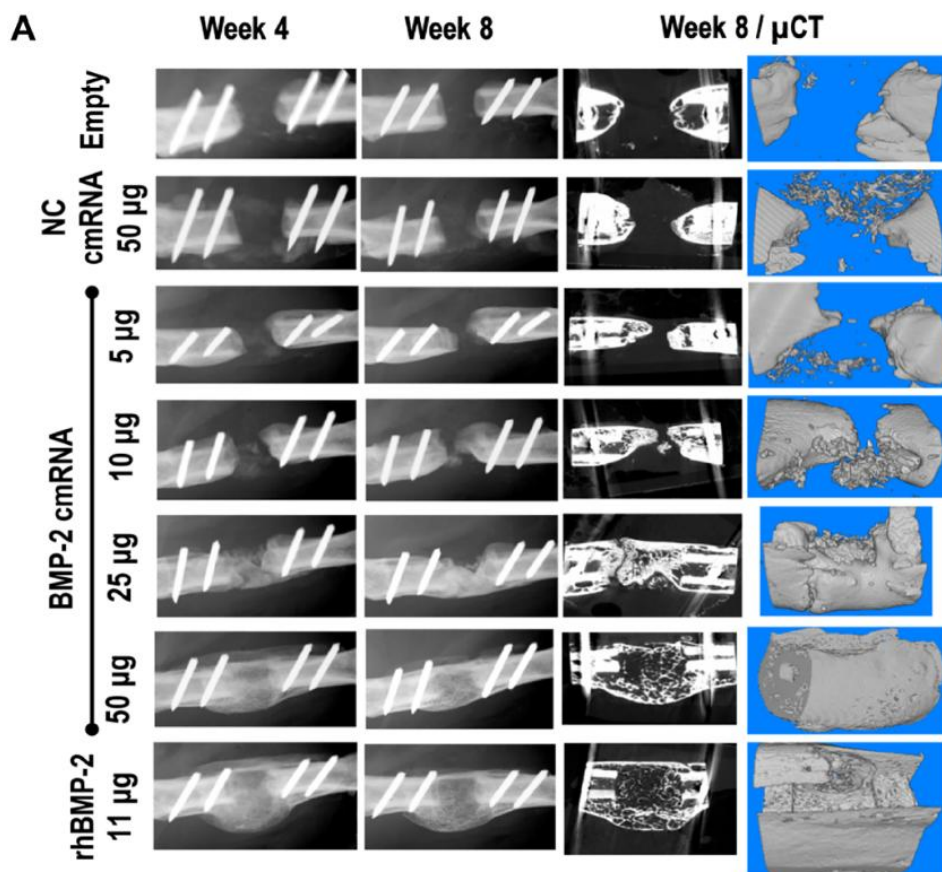


Figure 48 : Régénération osseuse en fonction de la dose d'ARNm, de (De La Vega et al. 2022).

Dans une étude antérieure, une comparaison de la production de protéines BMP-2 in vitro à l'aide d'ARNm modifiés (5iU/5iC ou s2U/m5C) a été réalisée :

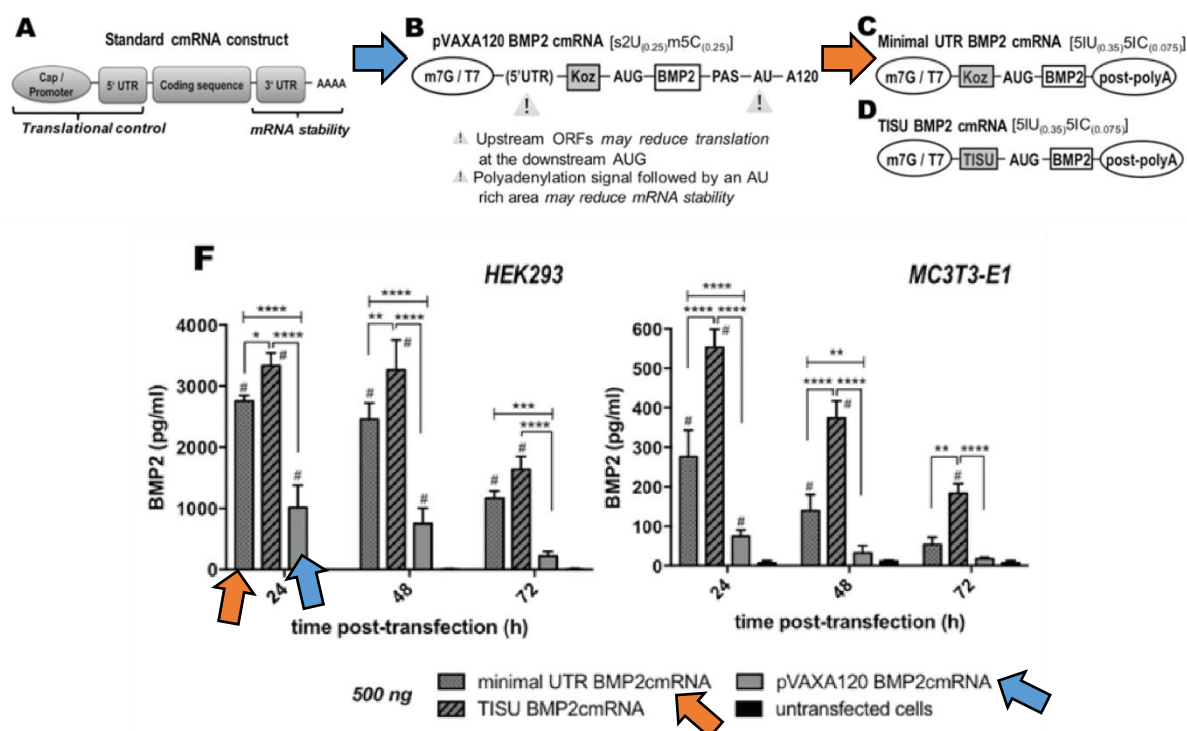


Figure 49 : Production de BMP-2 au cours du temps, adapté de (Wen Zhang et al. 2019).

On observe que les ARNm 5iU/5iC (flèche orange) induisent près de 3 fois plus de BMP-2 que les ARNm s2U/m5C (flèche bleue) 24h après transfection des HEK293 (~2800 contre 1000pg/mL). De plus, le même résultat est observé sur les cellules MC3T3-E1 (pré ostéoblastes). En somme, ces différences significatives démontrent l'intérêt de la 5iU et la 5iC pour la production de BMP in vitro (Wen Zhang et al. 2019). Bien que les séquences des deux ARNm diffèrent au niveau de leur 5' et 3'UTR (figure 49 B et C), les auteurs ont confirmé une amélioration robuste de la traduction grâce aux iodo-nucléotides.

Afin de délivrer nos ARNm, les deux méthodes (co-transfection avec ARNm NS1 et ARNm incorporant des iodo-nucléotides) ont été comparées. Pour ce faire, les ARNm ont été transfectés à l'aide de la Lipofectamine MessengerMAX™ (LFM), un agent de transfection commercial. Ce vecteur a été choisi pour sa capacité à transfecter un large panel de cellules (lignées et cellules primaires). De plus, l'utilisation de cette Lipofectamine est répandue dans la délivrance d'ARNm au sein de RAM en régénération osseuse (Geng et al. 2021; P. Wang et al. 2021; Oude Egberink et al. 2022). Néanmoins, puisque notre étude vise à optimiser un système de délivrance lipidique, les intermédiaires d'optimisation ont aussi été testé pour la délivrance d'ARNm.

5.1.2. Optimisation des conditions de transfection

Avant de procéder à une comparaison des différentes stratégies étudiées, une optimisation des conditions de transfection a été réalisée avec un ARNm commercial (EGFP-5moU, OzBioscience®). L'objectif était de fixer les conditions de transfection in vitro : quantité d'ARNm par cellules (pg/cellules), temps d'incubation des complexes, milieu de transfection. Le récapitulatif des conditions testées est indiqué dans le tableau suivant :

Table 5 : Récapitulatif des conditions de transfection

	Conditions testées	Conditions retenues
Qté ARNm/cellules (pg/cellules)	5 – 10 – 20 – 30	10
Temps incubation	4h – 6h – 24h	24h
Milieu de transfection	HEPES	HEPES

Par la suite, dans le but d'évaluer l'expression des ARNm et les performances des vecteurs, l'expression d'ARNm codant pour l'EGFP a été évaluée par cytométrie en flux. Le pourcentage de transfection (pourcentage de cellules exprimant l'EGFP) et la fluorescence moyenne (MFI : intensité de fluorescence moyenne) ont été évalués.

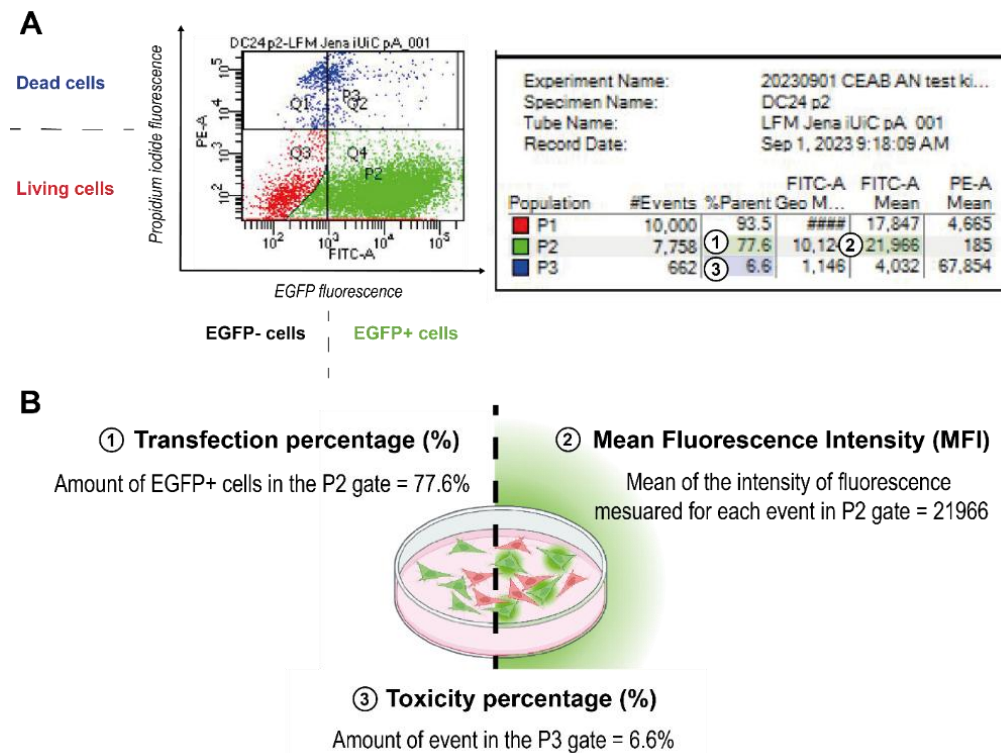


Figure 50 : (A) Données brutes de cytométrie en flux, 24 h après transfection de cellule DC2.4 avec de l'ARNm EGFP. (B) Illustration et description des données recueillies, réalisé sur BioRender.com

Le pourcentage de transfection (1, figure 50) est la proportion de cellule exprimant l'EGFP. Les MFI (2, figure 50) sont la moyenne des intensités de fluorescence mesurées pour chaque échantillon (axe des abscisse). Afin d'étudier la cytotoxicité des formulations, de l'iodure de propidium (IP, 1µg/µL) est dilué extemporanément au 100^{ème} avant la lecture des échantillons pour distinguer les cellules mortes des cellules vivantes. En effet, les cellules mortes sont perméables à l'IP, permettant sa fixation à l'ADN ce qui induit une fluorescence mesurée sur l'axe des ordonnées.

Ces trois mesures nous permettent de caractériser l'efficacité de transfection ainsi que la cytotoxicité de nos formulations.

5.1.3. Etude de l'ARNm NS1 pour l'amélioration de l'expression des ARNm

Dans le but d'évaluer le potentiel de l'ARNm NS1, des ARNm codants des gènes rapporteurs ont été transfectés, avec ou sans NS1. Les données ont été comparées afin de déterminer une augmentation de l'expression, ou une diminution de l'immunogénicité induite par NS1.

Le pourcentage de transfection, l'intensité de fluorescence et la cytotoxicité ont été mesurées par cytométrie en flux 24h après transfection d'ARNm codant l'EGFP, avec ou sans ARNm NS1. De plus, la bioluminescence a été mesurée par IVIS, 24h après la transfection d'ARNm codant la nanoluciférase (Nanoluc, Nluc), dans les mêmes conditions.

Les transfections ont été réalisées en adaptant le protocole proposé par (P. Wang et al. 2020). Brièvement, pour 1,0µg d'ARNm formulé : 0,75µg d'ARNm d'intérêt + 0,25µg d'ARNm NS1 sont complexés. Pour les conditions sans NS1 : 0,25µg d'un autre ARNm est complexé (ex : 0,75µg d'ARNm EGFP + 0,25µg d'ARNm Fluc).

Nous avons validé le potentiel de l'ARNm NS1 sur plusieurs cellules d'intérêt, qui correspondent à des cellules présentes au niveau du site de lésion osseuse (MSC, fibroblastes, macrophages). Aussi, les C2C12 BRELUC ont été testées. Ce sont des myoblastes génétiquement modifiées avec un gène rapporteur (luciférase) en aval d'un promoteur BRE (BMP-Responsive Element), qui permettent d'évaluer l'activation de la voie de signalisation des BMP, dépendante des SMAD (Logeart-Avramoglou et al. 2006; Ngalle Loth et al. 2025).

Evaluation de l'ARNm NS1 via l'expression de l'EGFP

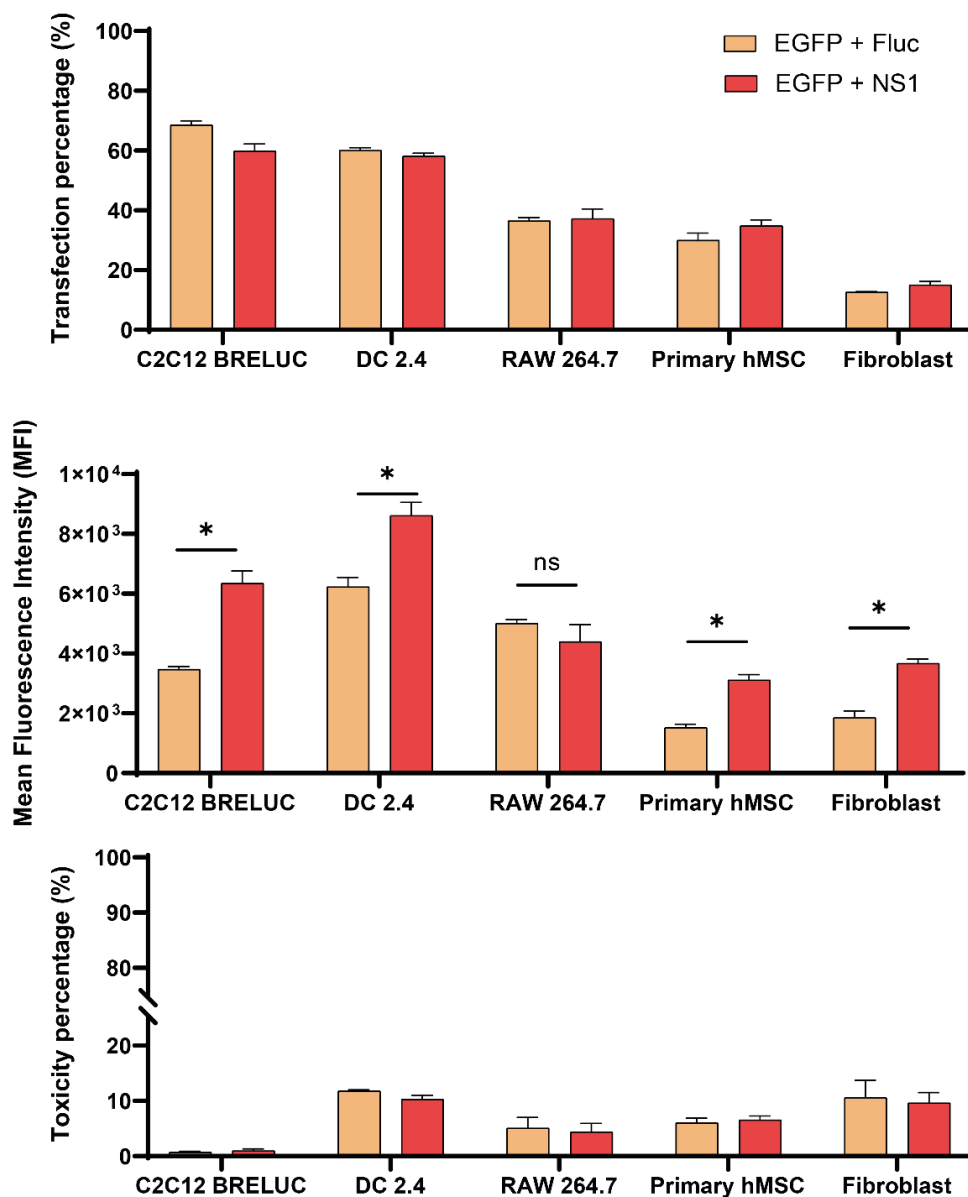


Figure 51 : Efficacité de transfection en présence ou absence de l'ARNm NS1, 24h après transfection par la Lipofectamine MessengerMAX™, par cytométrie en flux.

Au niveau du pourcentage de transfection, nos résultats montrent que la présence de l'ARNm NS1 a peu d'influence, et cela indépendamment du type cellulaire. Il en est de même pour la cytotoxicité. En revanche, on observe que la présence de l'ARNm NS1 permet d'augmenter l'intensité de fluorescence (MFI). Toutefois, bien que l'augmentation soit significative (jusqu'à 2 fois plus pour les MSC humaines primaires), elle reste légère et dépend du type cellulaire. En effet, aucune amélioration de l'expression n'est mesurée sur les RAW 264.7 (macrophages).

Evaluation de l'ARNm NS1 via l'expression de la nanoluciférase

Des cinétiques ont été réalisées pour évaluer l'effet de l'ARNm NS1 au cours du temps sur l'expression de l'ARNm Nanoluc.

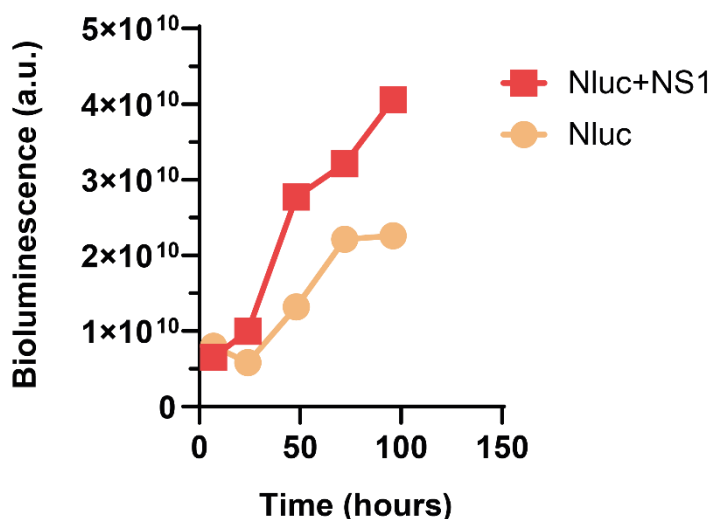


Figure 52 : Cinétique d'expression de l'ARNm nanoluciférase délivré à l'aide de la LFM sur C2C12 BRELUC.

En présence de l'ARNm NS1, la bioluminescence induite est supérieure. Ces résultats démontrent un effet positif de l'ARNm NS1 sur l'expression de l'ARNm co-transfecté, ce qui rejoint nos résultats précédents.

En somme, les tests réalisés avec l'ARNm NS1 ont permis de confirmer l'amélioration de l'expression des ARNm d'intérêt, dans nos conditions expérimentales. Cela est confirmé sur plusieurs types cellulaires, et avec différents gènes rapporteurs (EGFP et Nanoluciférase).

5.1.4. Etude des nucléotides modifiés pour l'amélioration de l'expression des ARNm

L'ARNm chimiquement modifié a été testé en comparaison avec un ARNm non modifié codant le même gène. Les transfections ont été réalisées en utilisant un liposome cationique, décrit dans la section suivante, ou la LFM en suivant le protocole suivant (Ngalle Loth et al. 2025).

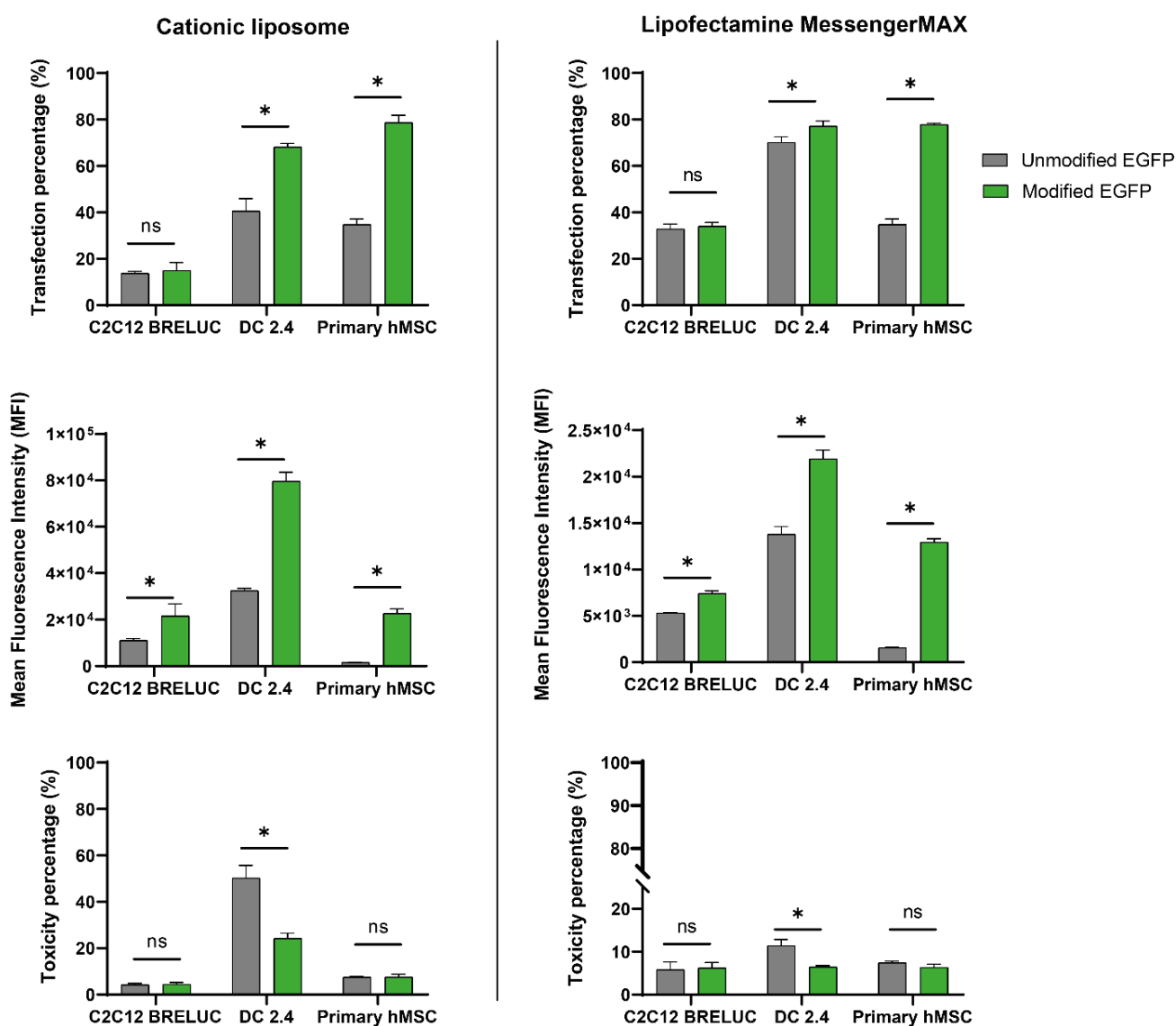


Figure 53 : Efficacité de transfection et cytotoxicité en fonction du type cellulaire, 24 h après transfection par le Lip100 ou la LFM

A l'instar de nos résultats avec l'ARNm NS1, nos résultats démontrent que les iodo-pyrimidines (5iU/5iC) incorporés dans l'ARNm induisent une amélioration de l'efficacité de transfection des ARNm. Cependant, outre l'augmentation de MFI qui est aussi constatée avec

NS1, on observe une augmentation significative du pourcentage de transfection sur les DC 2.4 (+20% avec le liposome cationique, +10% avec la LFM) et sur les cellules souches mésenchymateuses primaires humaines (+45% indépendamment du vecteur utilisé). De plus, les ARNm modifiés permettent de diminuer la cytotoxicité induite sur les cellules dendritiques, jusqu'à -30% avec le liposome cationique.

Une comparaison directe des deux méthodes, met en évidence les différences de transfection, notamment au niveau des MFI.

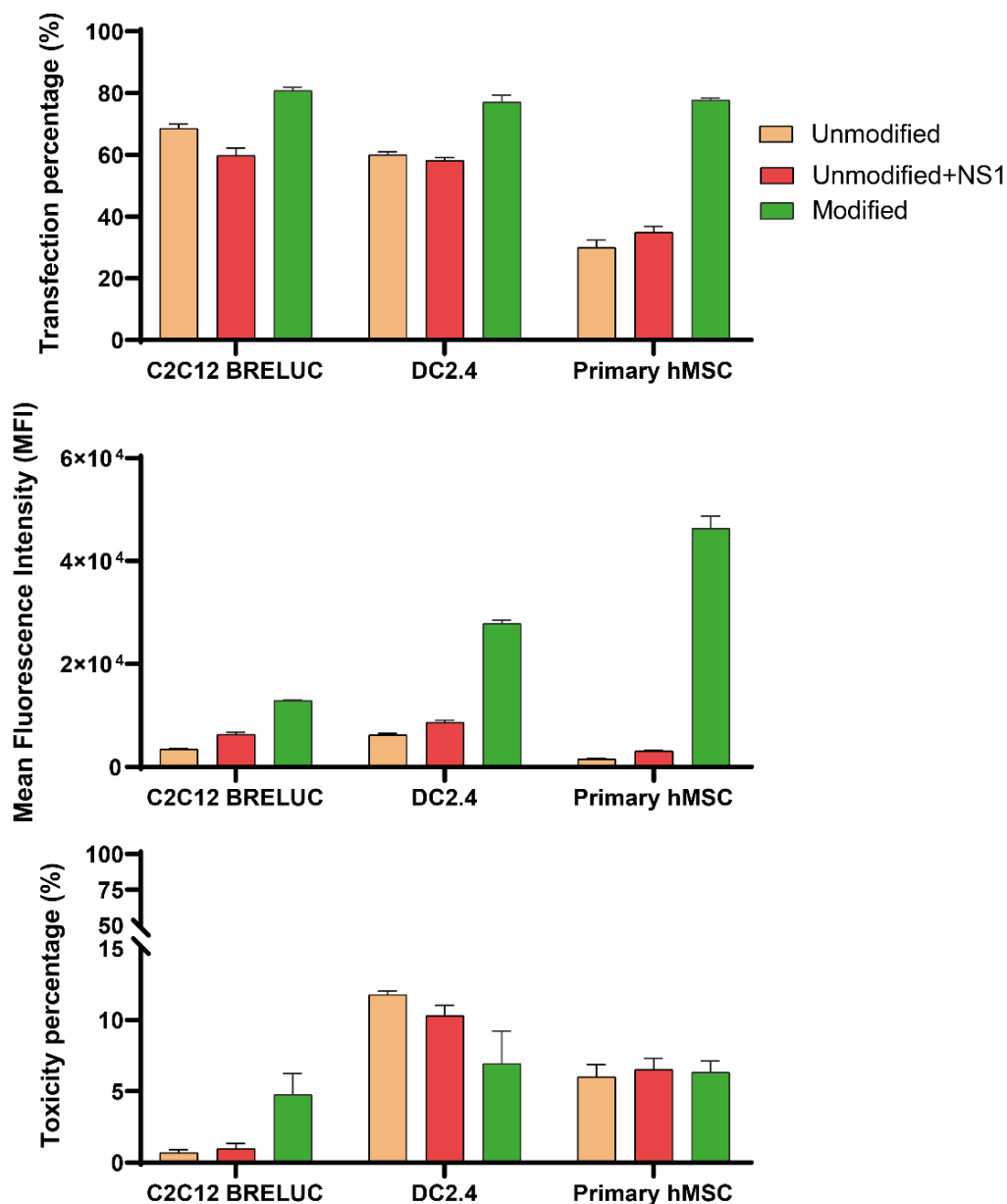


Figure 54 : Comparaison de la co-transfection de l'ARNm NS1 ou de l'incorporation de iodo-nucléotides pour la délivrance d'ARNm EGFP par cytométrie en flux

En conclusion, bien que les deux techniques permettent d'améliorer l'expression des ARNm d'intérêt, nos résultats montrent un avantage conséquent des ARNm chimiquement modifiés par rapport à la co-transfection avec l'ARNm NS1. En effet, ils permettent l'amélioration de l'expression des ARNm indépendamment du vecteur, et du type cellulaire en induisant des MFI bien plus importantes.

Par conséquent, les ARNm synthétisés pour la suite de nos travaux incluent des bases modifiées (35% iodo-uridine et 7,5% iodo-cytidine) (De La Vega et al. 2022). Une fois les ARNm produits, ils ont été analysés par électrophorèse capillaire puis stockés à -80°C.

5.2. Production du vecteur : le Lip100,

Dans le but de développer un vecteur performant pour la signalisation ostéogénique, plusieurs vecteurs ont été testés. Des manipulations préliminaires ont démontré que le « Lip100 », un liposome qui sera décrit dans la section suivante, serait le vecteur le plus adapté au projet.

Le Lip100 est un liposome cationique composé de lipides phosphoramidates issus d'une recherche collaborative entre le CEMCA (« Chimie, Electrochimie Moléculaire et Chimie Analytique », UMR CNRS 6521) et notre équipe.

5.2.1. Les lipides phosphoramidates

Nos collaborateurs se sont intéressés à la conception de lipides cationiques bio-inspirés. Ces lipides cationiques sont composés de trois parties : une tête polaire, une queue hydrophobe et un linker qui les relie. Dans le cadre de nos travaux, le linker est un groupement phosphoré : phosphoramidate (voir figure 57). De plus, plusieurs modifications de la tête et de la queue ont été effectuées dans le but d'étudier leurs effets sur la physico-chimie des lipides et leurs influences sur la transfection.

5.2.2. Les lipides phosphoramidates cationiques

Leur attention s'est portée sur les modifications de la tête polaire, en fixant une queue (chaîne oléique, C_{18:1}) et le linker (phosphoramidate) qui avaient montré les meilleures performances en termes de transfection dans des études antérieures. Pour complexer efficacement les acides nucléiques, les têtes ont initialement été substituées par des acides aminés basiques (arginine, lysine, histidine). Or, comme l'imidazole de l'histidine n'est pas majoritairement protoné à pH physiologique (pKa ~6,04), le groupe imidazolium a été introduit pour garantir une charge cationique permanente.

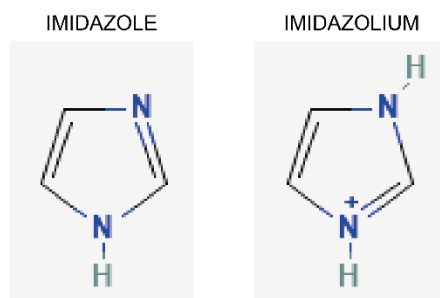


Figure 55 : Structure de l'imidazole et de l'ion imidazolium (PubChem).

En 2008, Mével et ses collaborateurs publient une étude dans laquelle ils évaluent l'efficacité de transfection d'ADN avec plusieurs lipides phosphoramidates cationiques qui diffèrent par leurs têtes polaires cationiques (figure 56).

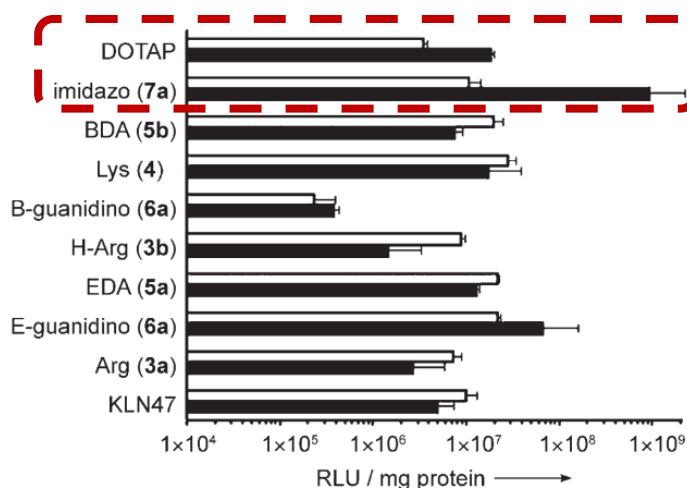


Figure 56 : Efficacité de transfection des liposomes formulés à l'aide de lipides phosphoramidates (Mével, Breuzard, et al. 2008).

Des liposomes phosphoramidate/DOPE sont formulés, et leurs efficacités de transfection sont comparées à celle de liposomes DOTAP/DOPE. Les résultats montrent que le lipide imidazolium phosphoramidate (7a, figure 56) couplé au DOPE induit 100 fois plus d'expression du gène rapporteur que la formulation DOTAP/DOPE, et cela, sans toxicité supplémentaire (Mével, Breuzard, et al. 2008).

En conclusion, cette étude démontre l'intérêt d'utiliser un lipide phosphoramidate cationique pour la délivrance d'acide nucléique. Par la suite, ce lipide phosphoramidate, qui possède une charge cationique permanente fut nommé **KLN25** (O,O-dioleil-N-(3 N-(N-methylimidazolium iodide)propylene) phosphoramidate).

5.2.3. Les lipides phosphoramidates ionisables

Peu de temps après, des lipides phosphoramidate ionisables ont été synthétisés et évalués, couplés à d'autres phosphoramidates cationiques pour la délivrance d'acide nucléique (Mével, Neveu, et al. 2008). Ces lipides phosphoramidates ionisables sont substitués au DOPE et utilisés comme lipides helpers pour améliorer l'efficacité de transfection via la facilitation de l'échappement endosomal. Les résultats montrent que ces lipides augmentent significativement l'efficacité des formulations étant dans certains cas meilleurs que le DOPE. Bien que le lipide phosphoramidate ionisable « **MM27** » (O,Odioleoyl-N-histamine phosphoramidate) n'ait pas induit les meilleures efficacités de transfection, il a permis d'améliorer considérablement la fusion des membranes (Mével, Neveu, et al. 2008).

Par la suite, un liposome cationique composé de KLN25/MM27 (ratio équimolaire, 1:1) désigné : Lip100, fut formulé.

5.2.4. Le Lip100

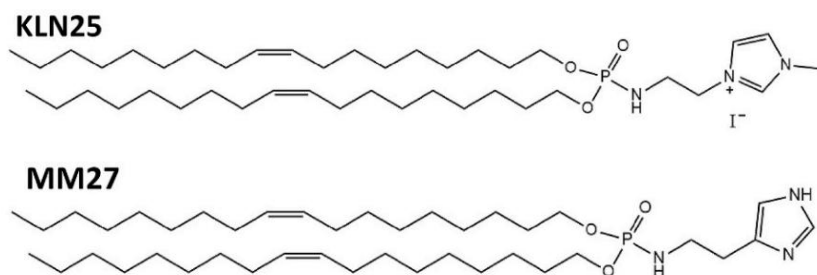


Figure 57 : Structure de lipides phosphoramidates cationique (KLN25) et ionisable (MM27).

Les structures et les efficacités de transfection du Lip100 formulé sous forme de lipoplexes (Lip100/acide nucléique) ou de lipopolyplexes (Lip100/acide nucléique/polymère cationique) furent étudiées in vitro (Perche et al. 2011; Gonçalves et al. 2014). Ces travaux ont démontré le potentiel du Lip100 pour la délivrance d'ADN, d'ARNm et de siRNA notamment sous forme de lipopolyplexes.

Par la suite, en 2021, Wang et ses collaborateurs ont utilisé le Lip100 formulé sous forme de LPR (lipopolyplexes : lipid, polymer, mRNA) pour délivrer de l'ARNm in vivo dans le cadre d'une application en régénération osseuse (P. Wang et al. 2021). Dans leurs conditions expérimentales, les lipoplexes Lip100 démontraient de meilleures efficacité de transfection que les LPR. Toutefois, les complexes devaient être lyophilisés pour permettre leur implantation in

vivo. Les LPR résistaient à la lyophilisation, conservant leurs structures et performances, mais pas les lipoplexes (figure 58). Pour ces raisons, l'étude fut menée à l'aide de LPR.

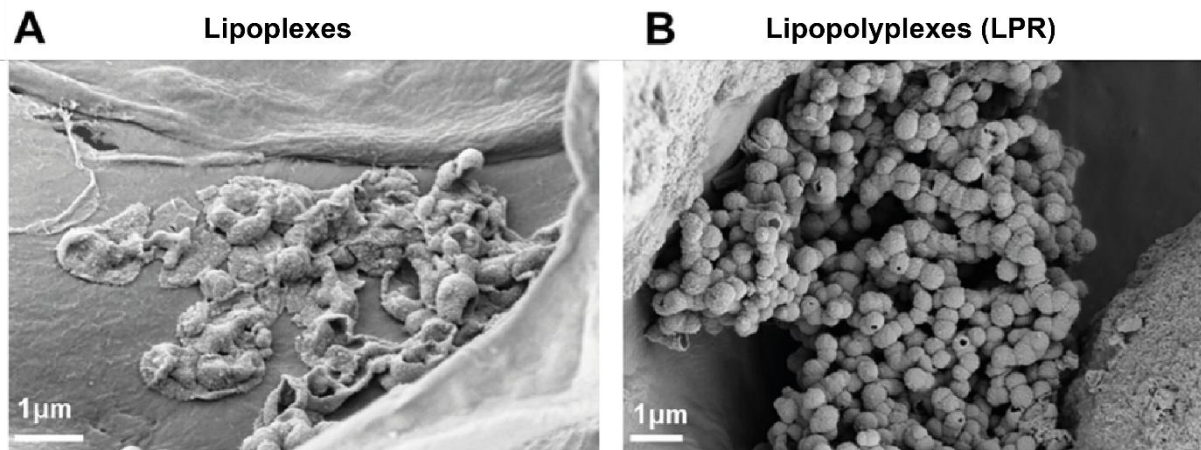


Figure 58 : Analyse par microscopie électronique à balayage de RAM chargées de lipoplexes ou de lipopolyplexes, après lyophilisation. Adapté de (P. Wang et al. 2021).

De plus, les travaux de Akhter *et al* ont montré l'intérêt d'utiliser le Lip100 pour délivrer efficacement de l'ARNm in cellulo parmi plusieurs formulations (Akhter et al. 2022).

Bien que le Lip100 soit un vecteur prometteur, c'est un liposome qui possède certaines limites, liées notamment à son processus de production.

L'optimisation du Lip100 pour une application en médecine régénérative sera traitée en détail dans la section 5.3. Enfin, pour conclure, on note que les lipides phosphoramidates entrent dans la formulation de liposomes, mais aussi de LNP (Delehedde et al. 2024).

5.3. Optimisation du vecteur : du Lip100 au LYX

Le Lip100 a été choisi comme vecteur car il démontre une meilleure efficacité de transfection que les autres vecteurs testés, *in vitro* et *in vivo* dans nos manipulations préliminaires. Cependant, ce liposome possède certaines limites. Bien que ce soit un vecteur performant, sa dispersité est élevée (PDI~0,3 à 0,4) (Akhter et al. 2022), ce qui induit des tailles variables, et donc des problèmes de reproductibilités. Par conséquent, ces interactions avec les cellules cibles varient d'un batch à un autre.

Pour surmonter cela, nous avons modifié son processus de production. La section suivante décrit en détail l'optimisation du Lip100 via l'étude de procédés visant à réduire sa dispersité, améliorer sa stabilité, sa cytotoxicité et ses performances.

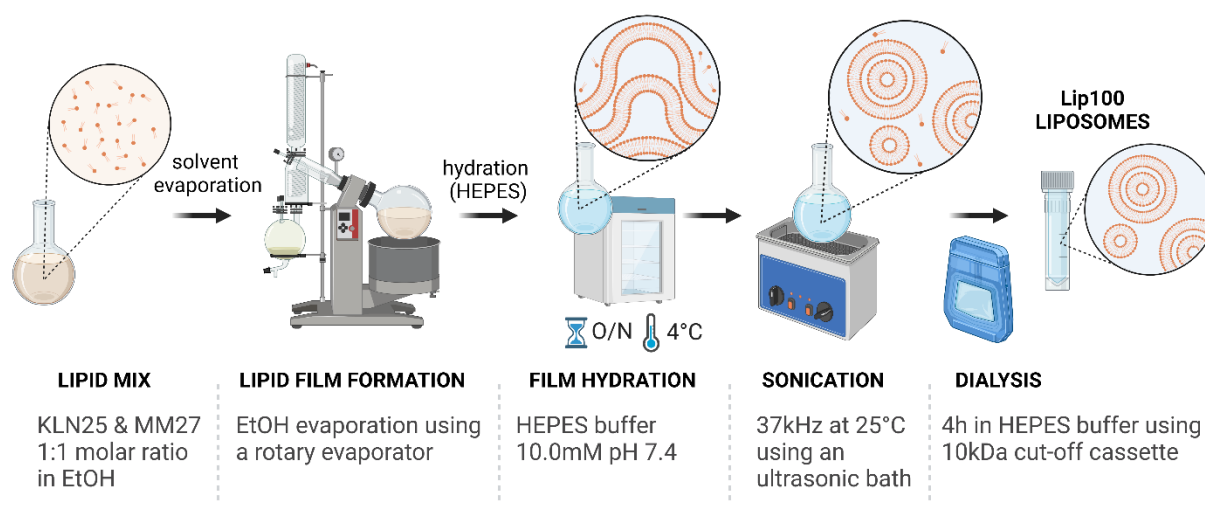


Figure 59 : Illustration du protocole de formulation du lip100, réalisé sur BioRender.com

5.3.1. Amélioration du stockage : la lyophilisation

Le stockage représente une limite des systèmes de délivrance lipidique (Muramatsu et al. 2022). Afin d'améliorer leur stockage, les liposomes ont été lyophilisés. La lyophilisation fut réalisée en présence de tréhalose, qui sert de cryoprotecteur (Has et Sunthar 2020). Cela permet de conserver les liposomes de manière stable à -20°C, permettant la production de lots à plus grande échelle. Ensuite, les liposomes sont réhydratés avant utilisation.

Les liposomes ont été caractérisés avant et après lyophilisation pour étudier les effets de la lyophilisation sur leur structure et leur efficacité de transfection.

En étudiant les effets de la lyophilisation sur les tailles et performances des liposomes et lipoplexes, deux différences significatives sont observées. D'une part la taille des lipoplexes est

plus grande avec le Lip100 lyophilisé que le frais. Mais aucune donnée ne nous permet de fournir une explication à cela. D'autre part, la toxicité induite chez les DC2.4 est plus importante avec le Lip100 lyophilisé. Bien que ces différences soient significatives, la différence mesurée est de 3,3% sur plus de 50% de toxicité, ce qui nous semble négligeable. Aussi, il est important de mentionner que ce taux de toxicité est diminué en présence d'ARNm modifié, diminuant à 25% (figure 53).

Outre cela, en comparant les Lip100 frais et lyophilisés/réhydratés, on observe que la taille, le PDI, l'efficacité de transfection et la cytotoxicité induite varient peu. En conclusion, la lyophilisation permet de conserver les liposomes sans nuire à leur qualité et leur performance. Une étape de lyophilisation a donc été ajoutée au processus de production des liposomes pour assurer leur stockage.

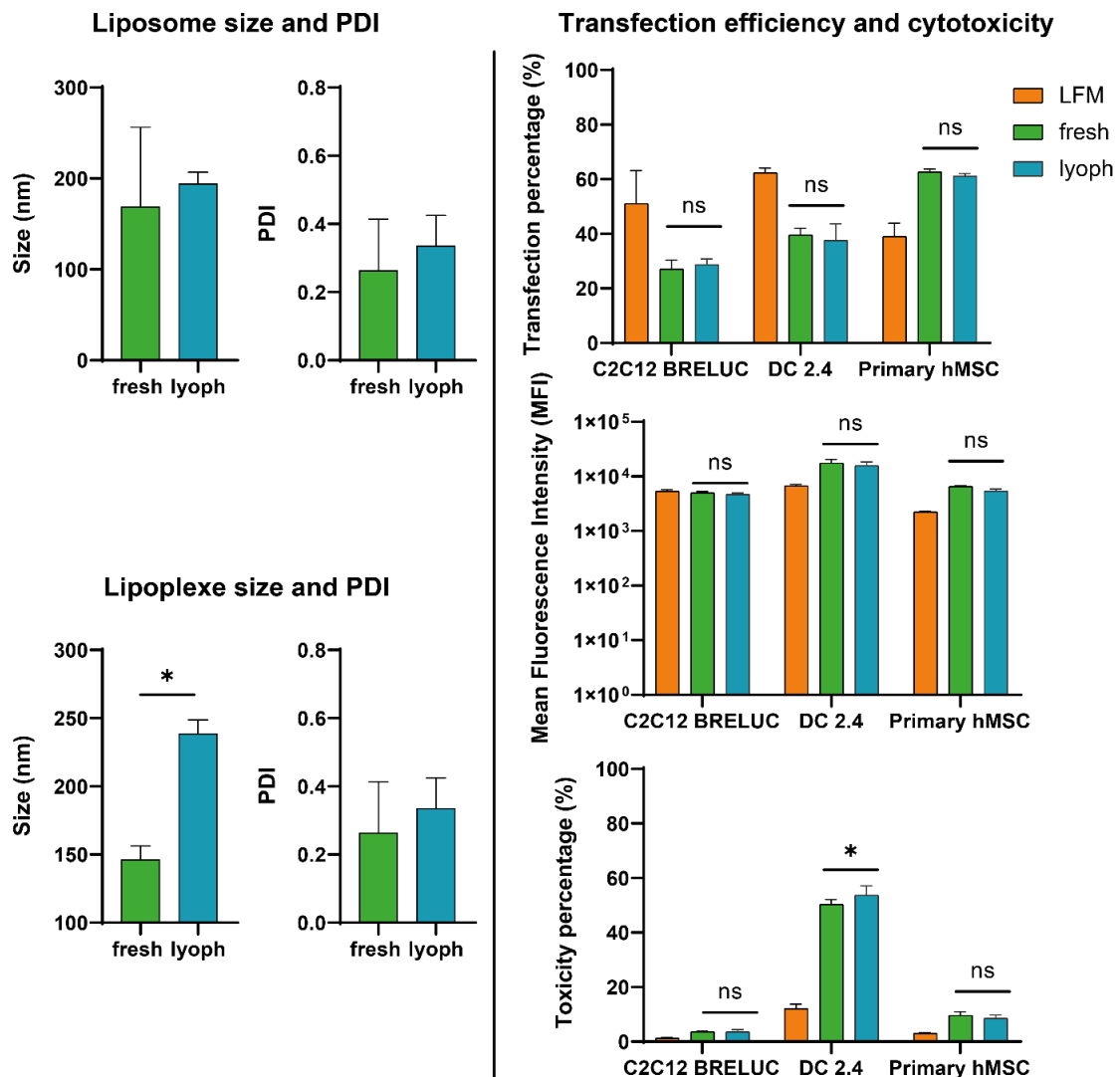


Figure 60 : Caractérisation de l'effet de la lyophilisation sur la taille, dispersité et performance des liposomes et lipoplexes à base de Lip100.

Toutefois, ces résultats montrent aussi que le Lip100 possède un PDI élevé (0,35) qui témoigne de variations de taille importantes au sein de la solution de liposomes.

Par conséquent, une optimisation est nécessaire pour diminuer ces variations de taille et améliorer la reproductibilité des particules, et donc des expérimentations. Pour ce faire, les liposomes ont été extrudés.

5.3.2. Amélioration de la reproductibilité : l'extrusion

Plusieurs membranes, avec des pores de tailles différentes, ont été testées (1,0 μ m – 0,4 μ m et 0,2 μ m). Trois conditions d'extrusion ont été évaluées : extrusion à 1,0 μ m, à 1,0 μ m puis 0,4 μ m et enfin 0,4 puis 0,2 μ m. Par la suite, les liposomes ont été analysés par DLS et leur efficacité de transfection a été évaluée.

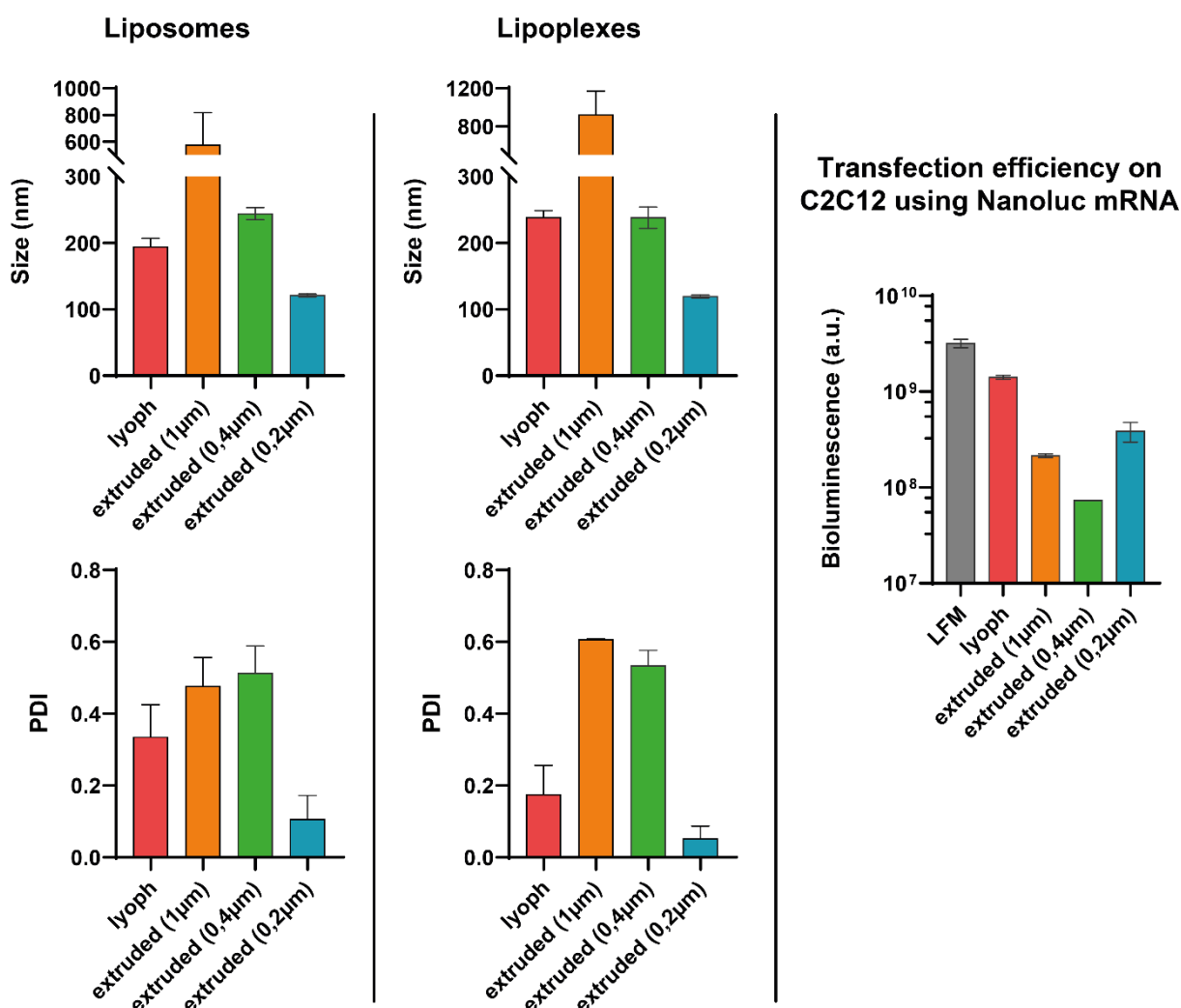


Figure 61 : Caractérisation des liposomes extrudés et des lipoplexes formulés.

En analysant les tailles des liposomes extrudés, on observe, comme attendu que la taille des nanoparticules diminue avec la taille des pores de la membrane (Armengol et Estelrich 1995). Pour les liposomes extrudés à 1µm et 0,4µm (1µm puis 0,4) aucune amélioration du PDI n'est observée.

En revanche le PDI des liposomes extrudés à 0,2µm (0,4 puis 0,2µm) chute à 0,1 par rapport à 0,33 pour les liposomes non extrudés. Ces résultats sont reproductibles et permettent donc l'obtention d'une solution de liposomes monodisperses.

Toutefois, l'amélioration de la qualité de la formulation ne doit pas être faite au dépend de l'efficacité de transfection. Par conséquent, une évaluation des performances des différents liposomes extrudés a été réalisé via la délivrance d'ARNm codant la nanoluciférase sur C2C12 BRELUC. Ces résultats démontrent que le liposome extrudé à 0,2µm possède la meilleure efficacité de transfection parmi les 3 modalités d'extrusion testées. Cependant, l'efficacité de transfection du liposome extrudé est inférieure à celle du liposome non extrudé (4×10^8 vs $1,4 \times 10^9$, figure 61). Afin d'optimiser l'efficacité de transfection des liposomes lyophilisés et extrudés, une étude du ratio N/P a été menée (voir section 5.3.3).

En conclusion, la lyophilisation permet d'améliorer le stockage des liposomes sans nuire à leur qualité. De plus l'extrusion (0,4µm puis 0,2µm) permet d'améliorer l'uniformité de taille des liposomes réhydratés.

Le Lip100 (L), lyophilisé (Y) et extrudé (X) a par la suite été désigné : **LYX**.

5.3.3. Amélioration des performances du LYX

Optimisation du ratio N/P : Le Lip100

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection du Lip100, nous avons testé plusieurs ratio N/P, un paramètre clé de la production des vecteurs lipidiques (Gary et al. 2013; Nele et al. 2024). Ce ratio correspond à la proportion de charges positives (N) des lipides par rapport à la proportion de charges négatives (P) présentes sur l'ARNm. Les lipoplexes aux ratios N/P : 0.5/1, 1/1, 2/1, 3/1 et 4/1 ont été évalués. Concrètement, au cours de la formulation des lipoplexes, le volume de liposome a été modulé par rapport au volume d'ARNm qui était fixe. Des cellules C2C12 BRELUC ont été transfectées avec de l'ARNm EGFP ou Nanoluciférase, puis une cinétique d'expression a été réalisée.

En fonction des ratios N/P des lipoplexes à base de Lip100, les efficacités de transfection varient, selon cet ordre : $0.5/1 < 1/1 < 2/1 < 3/1 < 4/1$. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du rapport N/P induit une amélioration des performances. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau des pourcentages de transfection ainsi que sur la cinétique d'expression de la bioluminescence. Cependant, lorsqu'on s'intéresse aux MFI les lipoplexes aux ratios N/P : 2/1, 3/1 et 4/1 possèdent des performances similaires.

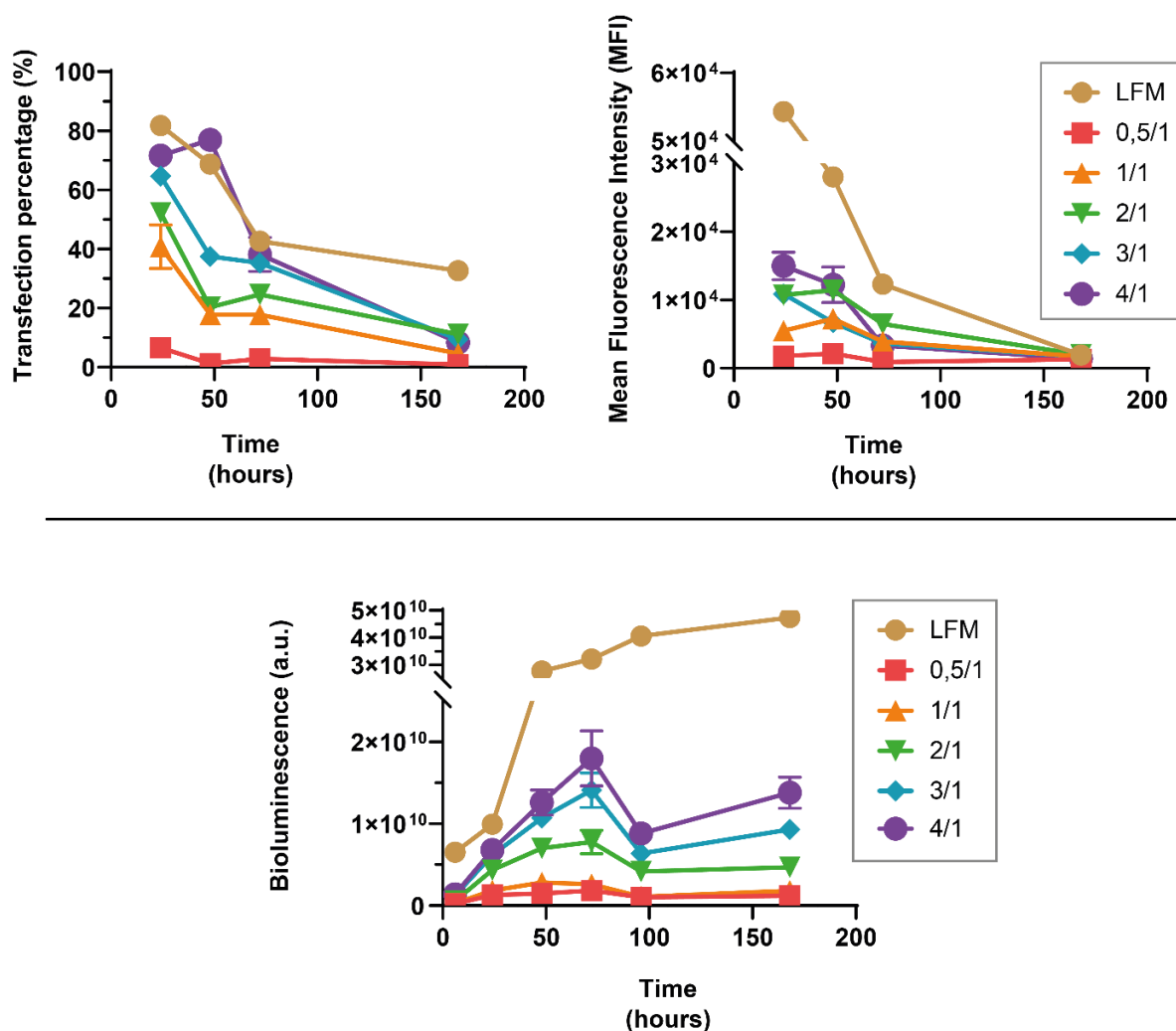


Figure 62 : Cinétique d'expression de l'EGFP (haut) et la nanoluciférase (bas), après transfection de cellules C2C12 BRELUC par des lipoplexes à base de Lip100.

Optimisation du ratio N/P : Le LYX in cellulo

Ces données suggèrent que nous pouvons augmenter la dose de LYX (N) par rapport à celle de l'ARNm (P) au cours de leur formulation pour améliorer les performances des lipoplexes. Pour ce faire, afin d'approfondir ces travaux et tester cette hypothèse, nous avons réalisé une étude de l'efficacité de transfection et de cytotoxicité sur 3 types cellulaires différents en testant les ratios N/P 4/1 et 2/1. La LFM a été utilisée comme contrôle.

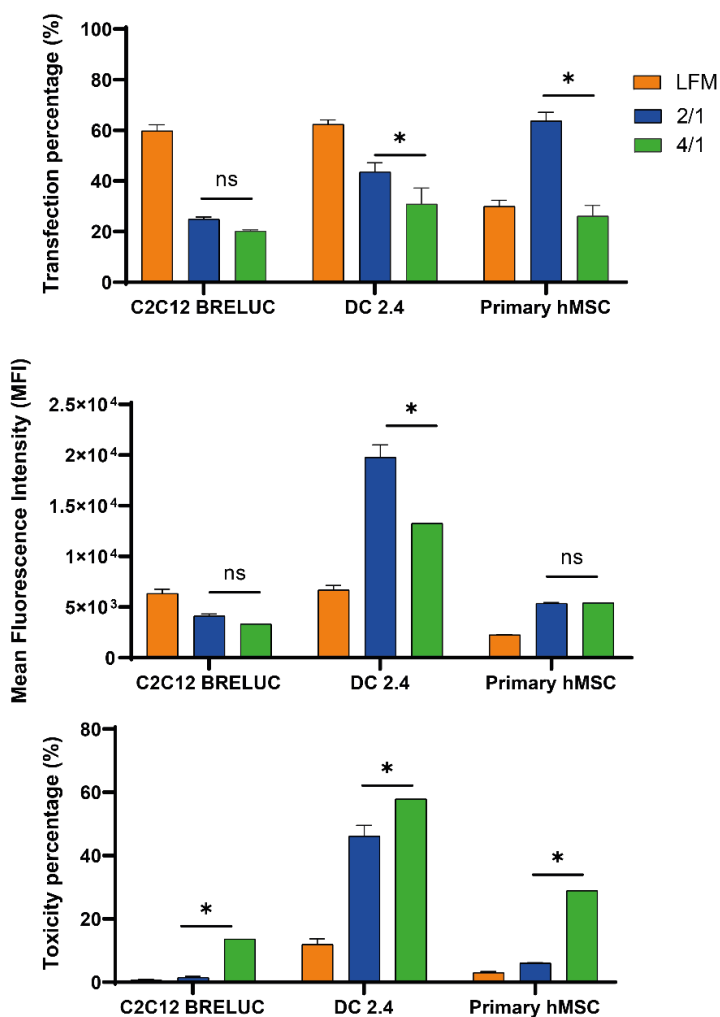


Figure 63 : *Evaluation de l'efficacité de transfection et la cytotoxicité du LYX à différents rapport N/P, 24 h après transfection par cytométrie en flux.*

Premièrement, la toxicité induite par les lipoplexes 4/1 est systématiquement supérieure à celle des lipoplexes LYX 2/1 (+20% sur les MSC humaines primaires). Deuxièmement, l'efficacité de transfection des deux ratios N/P est globalement similaire sur C2C12 BRELUC, mais les lipoplexes 2/1 induisent une meilleure expression dans les DC2.4 et les MSC humaines primaires.

En conclusion, ces résultats modèrent l'hypothèse selon laquelle l'efficacité de transfection augmenterait avec le ratio N/P. Le ratio N/P 4/1 n'induit pas de meilleures performances, de plus, il induit l'augmentation de la cytotoxicité. Le ratio 2/1 est donc considéré comme optimal.

Optimisation du ratio N/P : Le LYX in vivo

Nous avons finalisé cette comparaison in vivo, suivant le protocole décrit par (Medjmedj et al. 2022). Brièvement, des lipoplexes ont été formulés avec le LYX au ratio 2/1 ou 4/1, avec de l'ARNm codant la firefly luciférase. 1,0 µg a été administré par voie intramusculaire dans les pattes postérieures de souris Balb/c. Par la suite, les souris ont été imagées chaque jour jusqu'à extinction du signal.

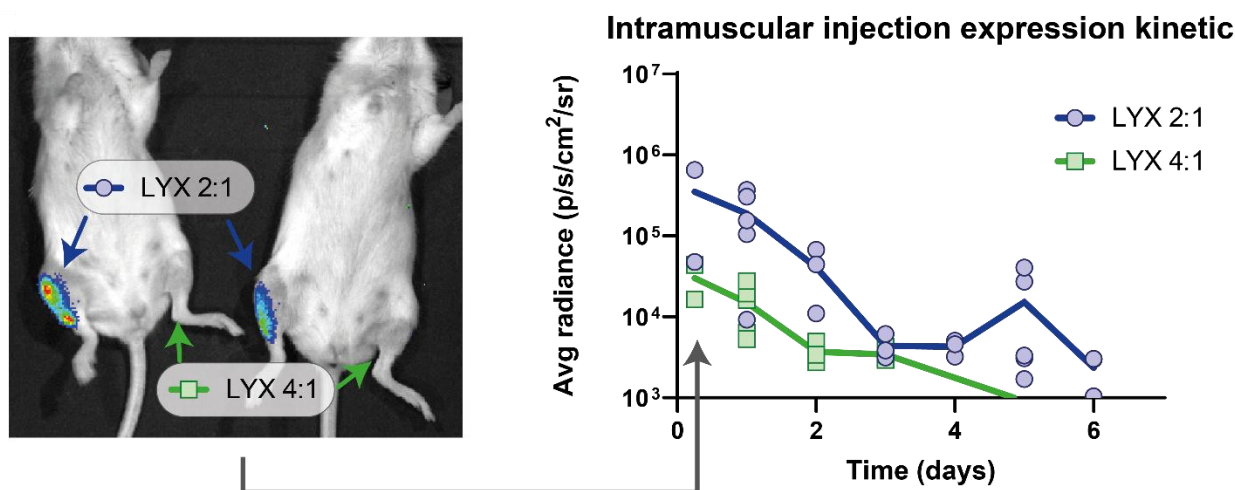


Figure 64 : Cinétique d'expression de la firefly luciférase après injection de lipoplexes par voie intramusculaire.

On observe une durée d'expression ainsi qu'une intensité du signal plus importante pour les lipoplexes au ratio N/P 2/1 par rapport au lipoplexes 4/1. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus in cellulo. En effet, la toxicité induite par les lipoplexes 4/1 et leur plus faible efficacité de transfection mesurées in cellulo pourraient expliquer leur moindre performance in vivo. Ces résultats démontrent donc que parmi les ratios testés le 2/1 est optimal pour la délivrance de l'ARNm in cellulo et in vivo. Par conséquent, le ratio 2/1 a été fixé et conservé pour l'ensemble des expérimentations réalisées par la suite.

En conclusion de ce chapitre, nos résultats démontrent l'importance de l'équilibre entre performance, toxicité et stabilité. En effet, les liposomes les moins stables peuvent produire dans certaines conditions les meilleures performances (figure 61). Toutefois, en fonction des applications et des besoins, il peut être nécessaire de faire des compromis pour ajuster le système dans un cadre précis. Mais, aucun de ces éléments ne peut être sacrifié au dépend d'un autre. L'optimisation des systèmes de délivrance repose sur l'identification d'un équilibre optimal.

CHAPITRE 6 : Caractérisation d'un vecteur lipidique, le LYX

Dans cette dernière étude, nous avons caractérisé les liposomes et lipoplexes à base de LYX décrit dans le chapitre précédent (figure 65). Pour ce faire, les structures (taille, morphologie) et fonctions (capacité à protéger et délivrer l'ARNm) du LYX ont été analysées. Comme pour la première étude (chapitre 4), nous nous sommes intéressés à l'échappement endosomal en étudiant le trafic intracellulaire. Toutefois, d'autres aspects critiques de la formulation de l'ARNm tels que le stockage de longue durée, la stabilité des nanoparticules et l'efficacité de transfection ont aussi été étudiés. Dans le cadre d'une application en régénération osseuse, la capacité du LYX à délivrer un ARNm codant pour un facteur ostéoinducteur a été évalué *in vitro*.

Enfin, les performances du vecteur ont été mesurées dans un hydrogel pour évaluer sa capacité à délivrer l'ARNm dans une RAM (RNA-activated matrix).

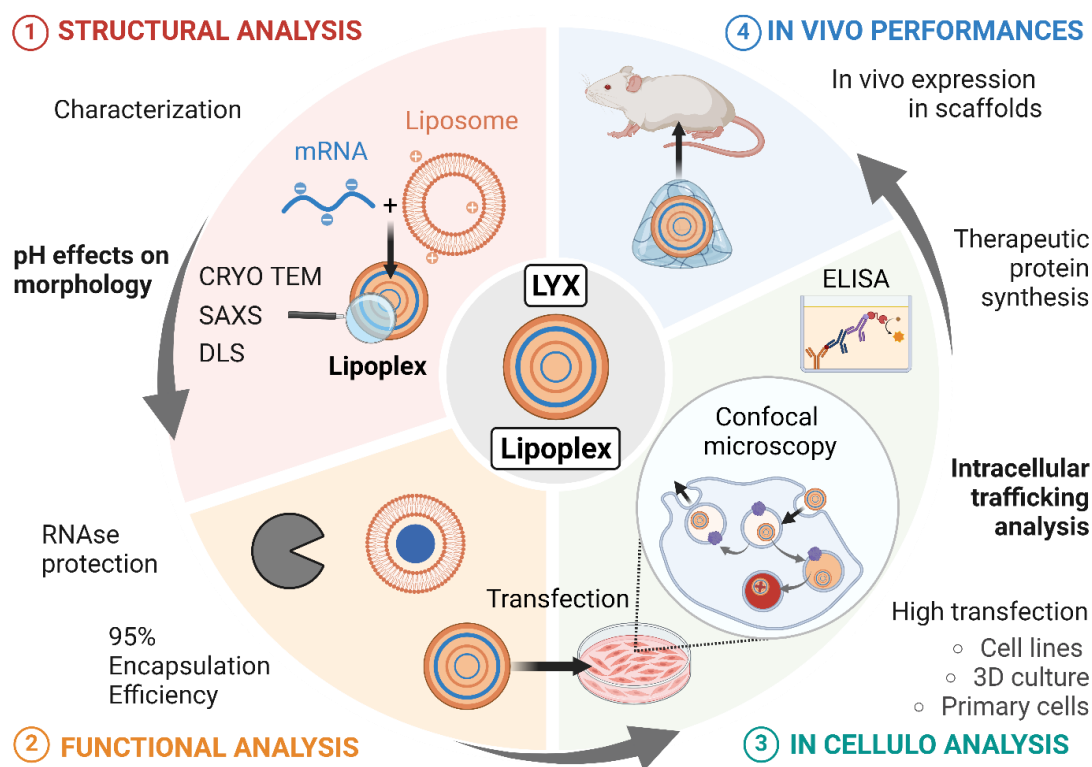


Figure 65 : Résumé graphique de (Ngalle Loth et al. 2025).



Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery

Albert Ngalle Loth^a, Manon Maroquenne^b, Ayoub Medjmedj^a, Franck Coste^a, Thomas Bizien^e, Chantal Pichon^{c,d}, Delphine Logeart-Avramoglou^{b,*}, Federico Perche^{a,*}

^a Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS UPR4301, Orléans, France

^b Université Paris Cité, CNRS, INSERM, ENVA, B30A, 75010, Paris, France

^c Inserm UMS 55 ART ARNm and LI2RSO, Université d'Orléans, F-45100 Orléans, France

^d Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, F-75035 Paris, France

^e Université Paris-Saclay, Synchrotron Soleil, 91190 Saint-Aubin, France

ARTICLE INFO

Keywords:

mRNA therapy
Histidylated liposome
Lipoplexes morphology
Delivery
Endosomal escape
Intracellular trafficking

ABSTRACT

The development of lipid-based mRNA delivery systems has significantly facilitated recent advances in mRNA-based therapeutics. Liposomes, as the pioneering class of mRNA vectors, continue to lead in clinical trials. We previously developed a histidylated liposome that demonstrated efficient nucleic acid delivery. In this study, the liposome preparation process was optimized by freeze-drying followed by extrusion to homogenize size distribution and improve storage stability. A comprehensive characterization of these LYX liposomes was performed, including evaluation in cellular and murine animal models.

LYX liposomes can be stored for up to one year at 4 °C, maintaining a stable size (150 ± 10 nm) and polydispersity index (0.10 ± 0.02), while preserving their transfection efficacy. They exhibit high encapsulation efficacy (~95 %) and protect mRNA from RNase degradation. Lamellar organization was confirmed by Small Angle X-ray Scattering and CryoTEM, and intracellular trafficking was examined using confocal microscopy. LYX-mRNA lipoplexes can transfect both cell lines and primary cells, albeit with a lower transfection efficacy compared to the commercial Lipofectamine MessengerMAX™ vector. Our data suggest that this could be attributed to slower cell uptake and reduced endosomal escape of LYX. LYX liposomes effectively delivered mRNA encoding therapeutic BMP2 and BMP9 molecules, producing significant amounts of functional proteins that successfully induced BMP signaling. In addition, *in vivo* studies demonstrated the potential of LYX lipoplexes when incorporated into hydrogels and implanted subcutaneously in mice. These findings provided evidence that LYX liposomes are a promising platform for mRNA delivery, offering versatility for multiple applications.

1. Introduction

Messenger RNA (mRNA)-based technology harnesses the cellular protein synthesis machinery to produce any protein or peptide of interest in transfected cells. mRNA therapeutics offer numerous advantages over conventional vaccine and drug delivery approaches, including rapid and scalable manufacturing, as well as the ability to address diverse applications through simple changes in mRNA sequence [1,2]. Unlike DNA gene delivery, which requires translocation to the nucleus before its expression can begin, mRNA expression occurs in cytosol, thereby avoiding the risk of opportunistic insertional mutagenesis [3]. Consequently, mRNA is increasingly being utilized in

various therapeutic areas, including vaccination [4,5], cancer immunotherapy [5–7] and regenerative medicine [7,8].

One limitation of this approach is that exogenous mRNA, synthesized by *in vitro* transcription (IVT), is recognized as viral RNA by cytoplasmic and endosomal nucleic acid sensors [9,10].

The clinical success of mRNA therapies has been partly achieved by the reduction of the immunogenicity of synthetic mRNA through the use of chemically modified mRNA (cmRNA). These cmRNA contain naturally modified nucleoside analogs like pseudouridine, N⁶-methyladenosine, or 5-methylcytidine, which prevent IVT mRNA-induced TLR activation, thereby increasing mRNA expression without adverse effects [4,6,10].

* Corresponding authors.

E-mail addresses: delphine.logeart@cnrs.fr (D. Logeart-Avramoglou), federico.perche@cnrs-orleans.fr (F. Perche).

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.010>

Received 8 November 2024; Received in revised form 23 December 2024; Accepted 6 January 2025

Available online 9 January 2025

0168-3659/© 2025 Published by Elsevier B.V.

The development of suitable delivery systems has been another key factor for the efficacy of mRNA therapy, as naked mRNAs are hardly taken up by cells due to their high molecular weight and negative charge [2]. A wide range of mRNA delivery systems have been developed to protect the synthesized transcripts from degradation and to promote their cellular uptake into the targeted cells. In most cases, these systems are made with cationic carriers that compact the mRNA via electrostatic interaction, complexation or encapsulation, leading to the formation of nanoparticles that the cell can take up by endocytosis [11,12]. Lipid-based systems including liposomes or lipid nanoparticles (LNPs) are the most used mRNA delivery carriers.

LNPs are currently the most advanced mRNA formulation and are composed of ionizable lipids and helper lipids combined with mRNA by microfluidic mixing, resulting in self-assembled 80–200 nm spherical nanoparticles [13]. For instance, the LNPs used in the approved mRNA COVID19 vaccines were formulated by mixing 4 components: ionizable lipid, phospholipid, cholesterol and polyethylene glycol-lipid (PEG-lipid). Each of these components must be produced in compliance with Good Manufacturing Practice (GMP) standards [14].

However, the use of other lipid-based delivery systems, in particular liposomes, one of the earliest mRNA formulations for cell transfection and for mRNA vaccination [15], remains a promising strategy. This approach is supported by numerous preclinical studies and ongoing clinical vaccine development projects (reviewed in [13,16]). Liposomes provide a simple and versatile method for formulating mRNA by mixing the mRNA directly with liposomes to form lipoplexes, typically within minutes [17]. Moreover, the liposomes used in clinical trials are composed of only two lipids in contrast to the four components used in LNPs. This reduced number of components not only decreases the costs associated with GMP-compliant lipid production, but is also expected to simplify regulatory approval requirements and lower manufacturing expenses [17,18].

We have previously reported the formulation of a histidylated liposome (Lip100) that demonstrated efficient nucleic acid delivery [19–22]. Lip100 is made of equimolar quantities of 2 lipids: the cationic lipid O,O-dioleoyl-N-(3 N-(N-methylimidazolium iodide)propylene) phosphoramidate (KLN25) and the fusogenic ionizable lipid O,O-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate (MM27) (Fig. 1A). KLN25

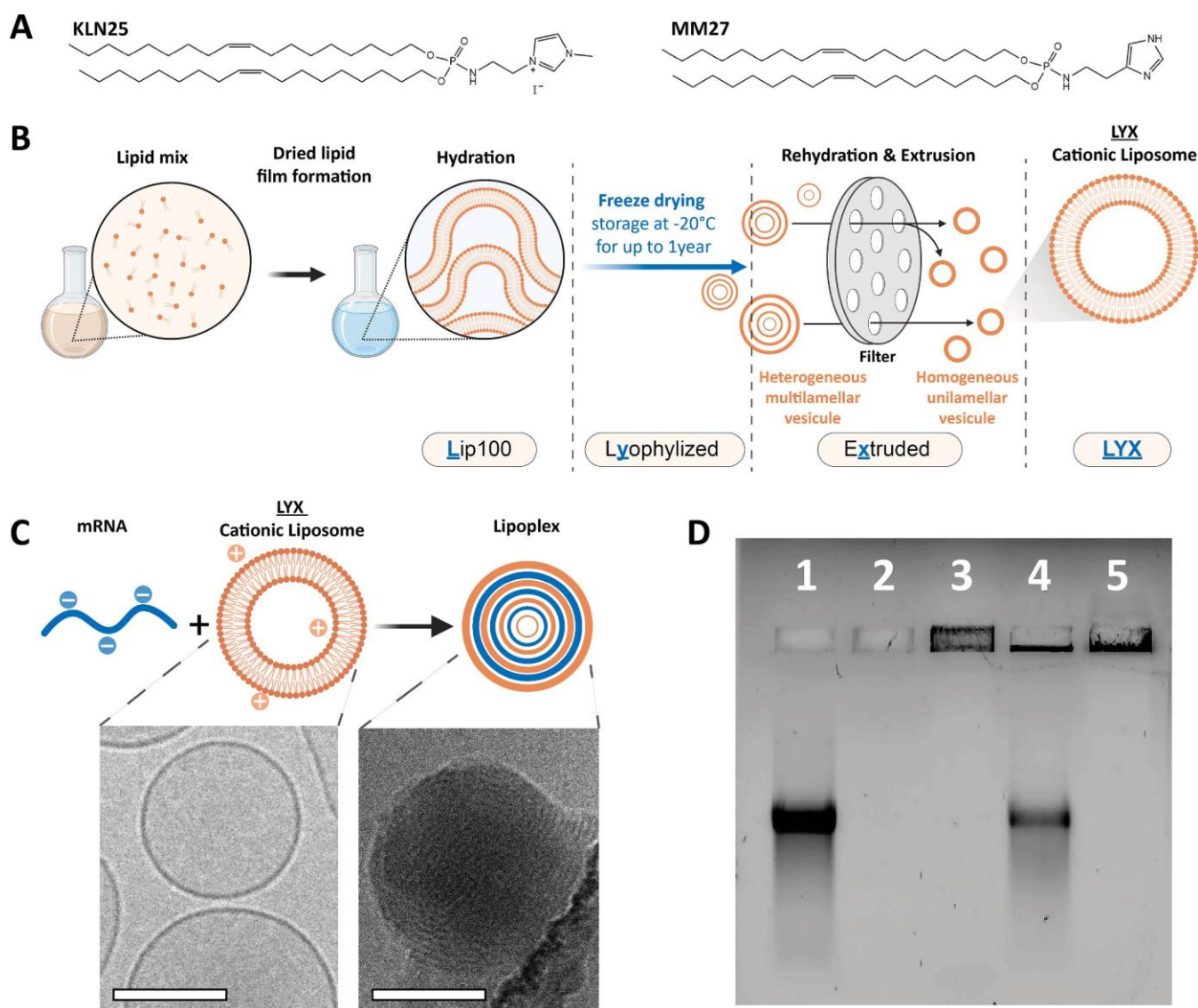


Fig. 1. Liposome and lipoplex formulation and characterization. (A) Chemical formula of the two lipids used in the liposome. (B) Main steps of the liposome synthesis. (C) Diagram of lipoplex formulation with corresponding cryo-TEM images of liposome and lipoplex (scale bar = 100 nm). (D) RNase protection assay: 1- Free mRNA; 2- Free mRNA after RNase treatment; 3- LYX-mRNA lipoplexes; 4- LYX-mRNA lipoplexes after RNase treatment followed by RNase inactivation and complex dissociation; 5- LYX-mRNA lipoplexes after RNase treatment.

possesses an *N*-methylimidazolium polar head conferring a permanent positive charge for nucleic acids condensation. The imidazole group of MM27, is protonated in endosomes facilitating mRNA release in the cytosol (endosome escape) [23]. However, Lip100 liposomes were of variable size (polydispersity index (PDI) of 0.34) [24] resulting in polydisperse mRNA lipoplexes (PDI 0.3) [25]. In fact, high polydispersity may present several drawbacks such as inconsistent mRNA encapsulation and delivery, variable cellular uptake and stability issues [26,27].

In this study, we have optimized the preparation process of Lip100 histidylated liposomes by incorporating lyophilization and extrusion steps. We show that the improved protocol produces monodisperse liposomes, here designed as LYX. We reported a detailed characterization of physicochemical properties (size, morphology and structure by cryoTEM and SAXS analyses) of LYX liposomes and lipoplexes along with an analysis of intracellular trafficking. We demonstrated that the optimized LYX formulation efficiently delivers mRNA in cell lines, primary cells and 3D cultures. This study is the first to evaluate histidylated liposomes for mRNA delivery in vivo and the first to compare the transfection potency of histidylated liposomes with the commercialized product Lipofectamine MessengerMAX™.

2. Materials and methods

2.1. Lipid synthesis

Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Merck (Saint-Quentin-Fallavier, France). O,O'-dioleoyl-N-[3 N-(N-methylimidazolium iodide)propylene] Phosphoramidate (KLN25) and O,O'-dioleoyl-N-histamine phosphoramidate (MM27) were synthesized by WuXi AppTec Co., Ltd. (Chengdu, China) as described previously [21,22].

2.2. EGFP-rab plasmids and mRNA synthesis

The EGFP-rab7 WT plasmid was provided by R. Pagano (Addgene plasmid #12605) [28], while the EGFP-Rab11a-7 plasmid was provided by M. Davidson (Addgene plasmid #56444) [29]. EGFP-Rab27A plasmid was provided by W. Gahl (Addgene plasmid # 8923) [30], and pFX-EGFP-Rab5 plasmid was provided by Y. Ohba (Addgene plasmid # 174454) [31].

Plasmids containing a T7 promoter, the 5'UTR of β -globin, and the 3'UTR of mtRNR1 and AES were used to produce the mRNA [32] encoding for either the enhanced green fluorescent protein (EGFP) [33] or the human Bone Morphogenetic Protein 2 (hBMP2) [34]. The sequence of hBMP2 was cloned from pVAX1-BMP2, provided by G. Feichtinger (Addgene plasmid # 137909) [34]. The RNA molecules containing an anti-reverse cap analog (ARCA) and a poly(A) tail were synthesized by IVT using the High Yield T7 RNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) with 35 % 5-iodo-uridine and 7.5 % of 5-iodo-cytidine [3]. The mRNA quality was assessed by capillary electrophoresis using an Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 600 LabChipKit® (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions [35]. Cap1-capped and 5-methoxyuridine modified firefly luciferase mRNA (Fluc-cmRNA) was purchased from Oz Biosciences, Marseille, France.

2.3. Liposome and lipoplex formulation

The liposomes were prepared as previously described by Perche et al. [36], then freeze-dried and extruded. Briefly, the lipids KLN25 and MM27 (Fig. 1A) were mixed in ethanol at a 1:1 molar ratio. Ethanol was then evaporated using a rotary evaporator until a lipid film was formed. The film was then hydrated overnight in HEPES ((2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) buffer 10 mM pH 7.4, yielding liposomes with a lipid concentration of 10.8 mM. The liposomes were sonicated at 25 °C and 37 kHz using an ultrasonic bath (Bioblock Scientific, Illkirch, France) for 5 min and dialyzed against 10 mM pH 7.4

HEPES buffer using dialysis cassettes (G2 Slide-A-Lyzer™, Thermo Scientific™) with a molecular weight cut-off of 10 kDa at 25 °C for 4 h. Liposomes were then freeze-dried and stored at −20 °C until use. The liposomes (hereafter referred to as LYX) were rehydrated and downsized by stepwise extrusion through 0.4 and 0.2 μ m pore size membranes using an Avanti Polar Lipids mini extruder (Fig. 1B).

The LYX-mRNA lipoplexes were prepared at a 2:1 N/P ratio (ratio of amino groups of the lipid to phosphate groups of the mRNA). 1 μ g mRNA and 1.2 μ L LYX liposomes (10.8 mM) were incubated separately in 250 μ L Opti-MEM™ for 5 min at room temperature. The LYX suspension was then added to the mRNA solution and incubated for 15 min. Complexes with Lipofectamine Messenger MAX™ (LFM, Thermo Fisher) were prepared following manufacturer's instructions.

2.4. Particle characterization

Particle size was measured using dynamic light scattering (DLS) on an SZ-100 nanoparticle analyzer (Horiba Scientific) in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. LYX liposomes stability was assessed by DLS on different batches stored for 2, 4, 7 or 12 months at 4 °C. Then, their performances were controlled by flow cytometry using cap1-capped and 5-methoxyuridine modified enhanced green fluorescent protein mRNA (EGFP-mRNA).

Then, the stability of LYX-mRNA complexes was assessed in 7% fetal bovine serum - HEPES at 37 °C by measuring the lipoplex size every 30 min using dynamic light scattering. The encapsulation efficacy was determined using Quant-iT™ RiboGreen (Thermo Fisher) after dissociation of lipoplexes with 2 % Triton-X100, as described in [37].

The RNase protection assay was performed as described in [36]. Briefly, 1 μ g of free or complexed mRNA was incubated with an RNase A/T1 mix (Thermo Scientific) for 1 h at 37 °C. Following RNase inhibition with Protector RNase Inhibitor (Roche), the remaining mRNA was mixed with RNA loading dye (Thermo Fisher) and ran on a 1 % agarose gel containing Quant-iT™ RiboGreen (Thermo Fisher). Gels were imaged using a GelDocXR+ imager (Biorad).

The structure of LYX-mRNA lipoplexes was analyzed using small angle X-ray scattering (SAXS) as a function of decreasing pH (from 7.5 to 4.5) in order to evaluate their morphology in the acidic environment found in endosomes after cell internalization. SAXS data were collected at the SWING beamline of the SOLEIL synchrotron (Saclay, France) using an incident beam of 12 keV and recorded on an EIGERX 4 M detector at a sample-to-detector distance of 0.5 m. We used the Foxtrot software (version 3.5.10) for data reduction and first analysis. The LYX-mRNA lipoplex morphology was further analyzed by cryo (TEM) as previously described [23,36] using a JEM-1400Plus electron microscope (Jeol, Japan) operating at 120 kV.

2.5. Cell culture

DC2.4 murine immune cells were a gift from Pr Kenneth L. Rock [38]. RAW-264 murine immune cells, HEK293 human kidney cells and HeLa human ovarian carcinoma cells were purchased from the American Type Culture Center (ATCC). C2C12-BRE/Luc cells containing a BMP-sensitive reporter gene were obtained after stable transfection with the BMP-responsive element (BRE) fused to the luciferase gene [39]. C2C12-BRE/luc, RAW-264 and HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma), containing 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 1 % antibiotics (Sigma). DC2.4 cells were cultured in RPMI 1640 medium, containing 10 % FBS and 1 % antibiotics. HeLa cells were cultured in Minimum Eagle's medium containing 10 % FBS, 1 % GlutaMAX™ (Gibco), 1 % MEM non-essential amino acids (Gibco™) and 1 % antibiotics.

Rat mesenchymal stem cells (rMSCs) derived from the bone marrow of 8-week-old male Wistar rats were collected as previously described [40]. Briefly, after euthanasia, the rat femurs and tibias were harvested aseptically, and bone marrow was flushed from the bone shafts with

alpha-MEM supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics and seeded onto 0.1 % gelatin-coated tissue culture dishes. Once the cells had adhered, approximately 5–7 days, non-adherent cells were eliminated by changing the culture medium, and the adherent cells were used as rMSCs. Human MSCs (hMSCs) were harvested from bone marrow from discarded bone tissue during routine bone surgery from 3 donors at the Lariboisière Hospital, Paris, France. The tissues were harvested with the respective donor's consent in accordance with the regulations of the Lariboisière Hospital. hMSCs were isolated from the bone marrow using a procedure as previously reported [23,41].

2.6. *In vitro* transfection and protein production

Lipofectamine Messenger Max™ (LFM, Thermo Fisher), a commercial transfection reagent, was used as a control. The transfection efficacy of lipoplexes was assessed both in a 2D culture (well plate) and a 3D environment (fibrin-based hydrogel). For 2D culture, cells at 70–80 % confluence were transfected with 0.5 µg of mRNA per well complexed with either LYX or LFM. Transfection efficacy was assessed by flow cytometry 24 h post-transfection using EGFP chemically modified mRNA (EGFP-cmRNA).

Toxicity-mediated cell death was assessed by adding propidium iodide (PI) to the samples prior to analysis (10 µg/mL final concentration) [42]. Cell-associated fluorescence intensity was measured using a FORTRESSA X20 flow cytometer with λ_{ex} = 488 nm and λ_{em} = 530 ± 30 nm for EGFP detection, and λ_{ex} = 561 nm; λ_{em} = 586 ± 15 nm for PI detection (Becton Dickinson). The fluorescence intensity was expressed as a mean fluorescence intensity (MFI) of 2500 events for primary cells and 10,000 events for cell lines.

For 3D culture, 100,000 rMSCs were mixed with lipoplexes containing 2 µg of Fluc-cmRNA (Oz Biosciences, Marseille) and embedded in a 130 µL fibrin gel (18 mg/mL fibrinogen and 25 U/mL thrombin) [43,44]. The gels were then incubated in culture medium at 37 °C and imaged 24 h and 48 h post-transfection in the presence of 150 µg/mL D-luciferin (Interchim) using a bioluminescence imaging system (IVIS Lumina II; Caliper Life Sciences).

The efficacy of the vectors in delivering mRNA to produce therapeutic proteins was tested in HEK293 and rMSCs using cmRNA (35 % of iodo-uridine and of 7.5 % iodo-cytidine) encoding either hBMP2 or hBMP9. Transfections were performed at 30 pg cmRNA/cell. At defined time points, the levels of secreted hBMP2 and hBMP9 in the supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Quantikine, R&D Systems, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The functionality of the produced hBMP2 and hBMP9 was evaluated by transfecting C2C12-BRE/luc cells with increasing amounts (5, 10, and 20 pg/cell) of cmRNA. Twenty-four hours post-transfection, the cells were lysed, and luciferase activity was measured using the Luciferase assay system (Promega) and expressed as relative light units (RLU) per milligram of protein. The results were normalized to the luminescence levels of non-transfected control cells.

2.7. Confocal microscopy

C2C12-BRE/Luc cells (25,000) were seeded on glass coverslips in 24-well plates. The next day, the cells were transfected with pDNA encoding either EGFP-Rab5 (small GTPase associated with early endosomes), EGFP-Rab7 (small GTPase associated with late endosomes), EGFP-Rab11 (small GTPase associated with recycling endosomes) or EGFP-Rab27 (small GTPase associated with exosomes) with 25 K branched polyethyleneimine at 0.5 µg mRNA per well. After 24 h of incubation at 37 °C, cells were incubated with LYX- or LFM-mRNA lipoplexes containing 0.5 µg of Cy3-labelled mRNA for 1 h or 4 h. Cells were then fixed at 1 h, 4 h, or 24 h post-transfection and imaged to assess the subcellular distribution of labelled lipoplexes using a LSM 980 Airyscan 2 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) [37]. Weighted Pearson's colocalization coefficients between Cy3-labelled mRNA and GFP-

labelled organelles were determined using Zen Blue software version 3.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.8. *In vivo* transfection efficacy

The animals were handled following the European Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for scientific purposes. The protocols of *in vivo* experiments were approved by the local Ethics Committee on Animal Research and authorized by the French Ministry of Agriculture (APAFIS#35857). The *in vivo* transfection efficacy of lipoplexes combined in a fibrin gel was assessed through subcutaneous implantation. Lipoplexes containing 5 µg of Fluc-cmRNA were embedded in 130 µL fibrin gel (18 mg/mL fibrinogen and 25 U/mL thrombin). The loaded gels were then implanted subcutaneously in 8-week-old male SWISS mice as previously described [43,44]. Mice were then imaged in a bioluminescence imaging system (IVIS Lumina II®; Caliper Life Sciences) at 24 h, 48 h, and 72 h post-implantation after local injection of 75 µL of 20 mg/mL D-luciferin substrate at each implantation site.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad software). All numerical data are expressed as mean ± standard deviation (SD). The *t*-test (for normally distributed variables) or Mann-Whitney test was used to compare the means of two data groups. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of more than two data groups. Experiments were performed in triplicate in three independent experiments. For all analyses, differences at *p* < 0.05 (*) were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Liposome and lipoplex formulation and characterization

The LYX liposomes containing equal molar amounts of KLN25 and MM27 (Fig. 1A) were formulated and prepared as shown in Fig. 1B. CryoTEM observation of LYX liposomes confirmed the presence of unilamellar vesicles (Fig. 1C), whereas Lip100 exhibited both unilamellar and multilamellar vesicles (Supplementary Fig. S1). When complexed with mRNA, the obtained LYX lipoplexes exhibit a lamellar organization (Fig. 1C). Analysis of the lipoplexes by gel electrophoresis (Fig. 1D) confirmed mRNA complexation (lane 3) and its protection from RNase degradation. While naked RNA was degraded by RNase (lane 2), LYX lipoplexes protected it from degradation (lanes 4 and 5).

Once lyophilized, Lip100 liposomes could be stored at −20 °C for at least 6 months without significant structural modification (Fig. 2A). When needed, the freeze-dried liposomes were rehydrated and extruded resulting in LYX liposomes. To assess the compatibility of LYX lipoplexes with physiological fluids, their size was monitored by DLS in presence of serum at 37 °C and no aggregation was observed after 9 h (Fig. 2B). LYX liposomes can be stored in solution at 4 °C for up to 12 months without any structural changes, maintaining a stable size of 150 ± 10 nm and a polydispersity index of 0.1 ± 0.02 whereas Lip 100 liposomes showed aggregation over time and a higher polydispersity (~0.3) (Fig. 2C and D). Furthermore, the transfection efficacy of lipoplexes formulated with LYX liposomes stored at 4 °C in DC2.4 cells remained stable (73–79 %) for up to 12 months (Fig. 2E). However, their ability to encapsulate mRNA decreased (from 95 % to 70 % between the 2nd and 12th month of storage) with a concomitant decrease in the mean fluorescence intensity (MFI) of transfected cell (Fig. 2E). Once lyophilized, Lip100 liposomes could be stored at −20 °C for at least 15 months without significant loss of transfection efficacy (Supplementary Fig. S2)."

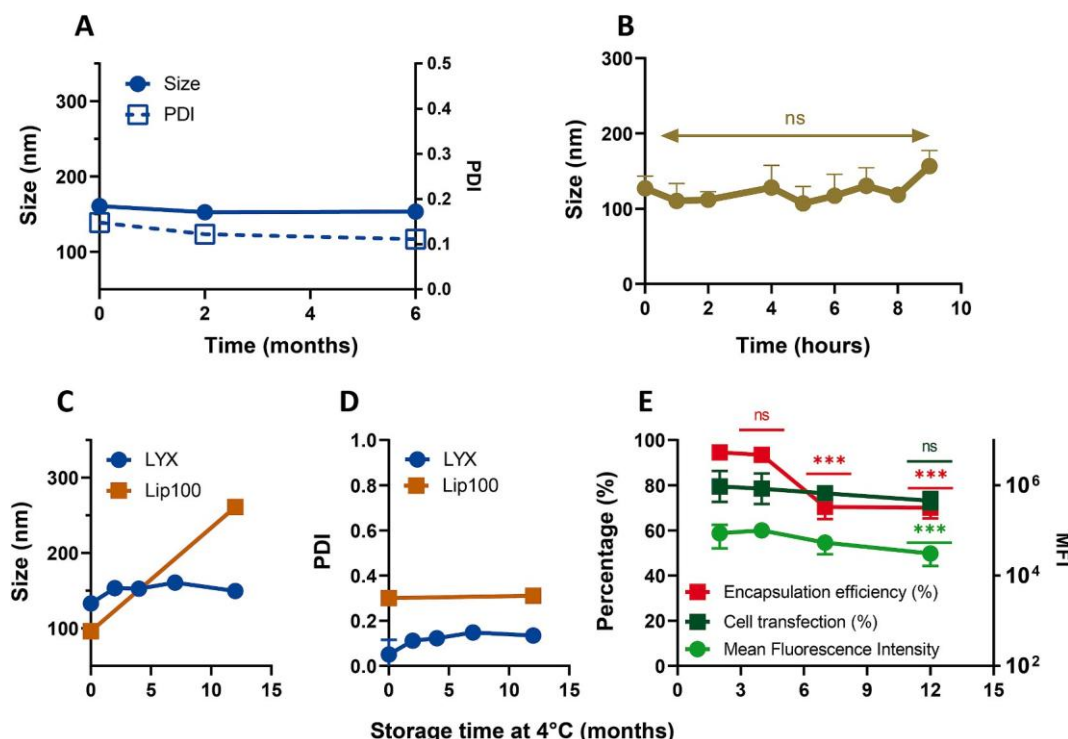


Fig. 2. Liposome and lipoplex stability. (A) DLS analysis performed after rehydration and extrusion of lyophilized liposomes stored at -20°C for 0, 2 or 6 months. (B) Stability of freshly prepared LYX lipoplexes as a function of time, in presence of serum. (C) DLS analysis of size, and (D) polydispersity of Lip100 and LYX liposomes from multiple batches, stored at 4°C for up to 12 months. (E) Percentages of encapsulation and cell transfection (left axis) and MFI per cell (right axis) in DC2.4 cells after 24 h, using different batches of LYX liposomes stored at 4°C for up to 12 months (statistics analysis were performed in comparison with the earliest time point).

3.2. pH-dependent morphology of lipoplexes

To investigate the morphology of LYX lipoplexes during the endosomal acidification, small angle X-ray scattering (SAXS) and cryo-TEM analyses were performed at decreasing pH levels to mimic the acidic microenvironment encountered during the endosomal trafficking. The SAXS profile of LYX liposomes without mRNA displayed a decreasing curve without any distinct peaks, indicating the presence of unilamellar vesicles (Fig. 3A). In contrast, the SAXS profile of mRNA-containing lipoplexes displayed a single peak at $q = 0.1155 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 3A), indicating an ordered structure and, therefore, a lamellar organization. The distance (d) between the repeating lipid layers, calculated from the position of the peak (q value) and using the equation $d = 2\pi/q$ [45], was estimated to be 5.44 nm. Interestingly, when comparing the SAXS profiles at decreasing pH, a single peak was observed from 7.5 to 6.5, while at pH below 6.0, a second peak appeared at higher q value (Fig. 3B). The position of the first peak remained constant at a q -value of $0.1155 \text{ \AA}^{-1}$ across all pH levels tested (except at the most acidic pH 4.5), corresponding to a spacing distance of 5.44 nm (Fig. 3C). The position of the second peak slightly increased with acidification, from $0.1226 \text{ \AA}^{-1}$ ($d = 5.12 \text{ nm}$) at pH 6.0 to $0.1243 \text{ \AA}^{-1}$ ($d = 5.05 \text{ nm}$) at pH 4.5. The appearance of a second peak suggests the presence of a secondary lamellar structure [46], which emerged only at acidic pH. Cryo-TEM images were taken at pH 6.5, 5.5 and 4.5 to examine the morphology of the LYX-mRNA lipoplexes (Fig. 3D, E and F). Under acidic conditions, the inner structure of the lipoplexes do not seem to be changed (Fig. 3H, J and L), with the same lamellar organization as that observed at neutral pH (Fig. 1C). However, whereas the rim of LYX-mRNA lipoplexes appeared thin at pH 6.5 (Fig. 3G), an amorphous and blurred peripheral layer appeared at pH 5.5 and 4.5 (Fig. 3J and K). The size and PDI of the LYX liposomes and lipoplexes were also measured across decreasing pH levels (from pH 7.5 to 4.5). No significant changes were observed in liposome size and PDI under acidic condition. However, a slight

decrease in the size of lipoplexes was observed (from 203 nm at pH 7.5 to 188 nm at pH ≥ 6.5) with the PDI remaining stable (Supplementary Fig. S3).

3.3. In cellulo transfection efficacy of LYX lipoplexes

The transfection efficacy of LYX was evaluated in comparison with Lipofectamine MessengerMAX™ (LMF) in several cell types using 10 pg/cell of EGFP mRNA. Expression was assessed 24 h post-transfection in a panel of murine and human cell lines, including murine C2C12 myoblasts, DC2.4 dendritic cells, RAW 264.7 macrophages, human HeLa cancer cells, HEK293 immortalized human kidney cells and, primary bone marrow-derived mesenchymal stem cells from rats (rMSC) and humans (hMSC). Overall, compared to LFM, LYX induced a lower transfection rate (ranging from 75 % to 17 %) compared to LFM (87 % to 29 %) across all cell types tested (Fig. 4A). A notable exception was the similarly low transfection percentage of RAW macrophages by LFM (25 %) and LYX (30 %) (Fig. 4A). Interestingly, the cellular mean fluorescence intensities (MFI) induced by LYX were either greater or similar to those induced by LFM, except for HeLa and HEK293 human cell lines (Fig. 4B). In addition, LFM induced less cytotoxicity (5–10 % range in all tested cells) compared to LYX (10–20 %) (Fig. 4C). Note that LYX could also deliver unmodified mRNA albeit with lower efficiency than modified mRNA (Supplementary Fig. 4). These data provided evidence that LYX is a potent and versatile mRNA delivery system for human and murine cell lines. An evaluation of liposome-mediated cytotoxicity using the MTT assay revealed dose- and cell type dependent cytotoxicity, with LYX exhibiting overall higher cytotoxicity compared to LFM (Supplementary Fig. 5).

3.4. LYX induce the production of functional therapeutic proteins

Next, we assessed the efficacy of LYX in delivering mRNA to produce

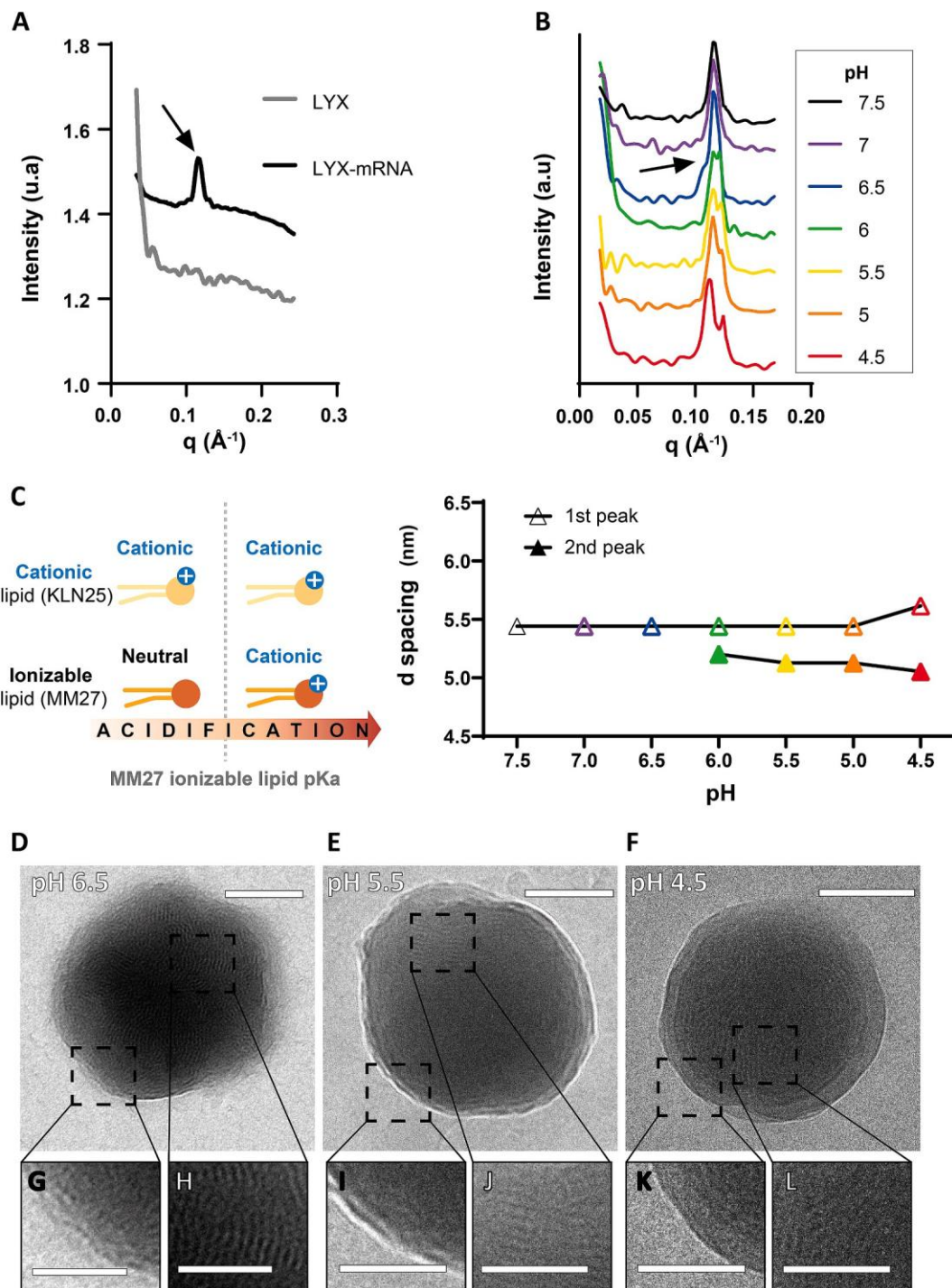


Fig. 3. Effect of pH acidification on lipoplex morphology by SAXS and cryoTEM analysis. (A) SAXS curves of LYX liposomes and LYX-mRNA lipoplexes at pH 7.4. (B) Comparison of the SAXS curves of lipoplexes at decreasing pH (from 7.5 to 4.5). (C) d spacing between the repetitive structures within the LYX lipoplexes, corresponding to each peak observed on SAXS curves, as a function of pH. (D) Cryo-TEM images of lipoplexes at pH 6.5, (E) 5.5 and (F) 4.5 with magnification of the peripheral (G, I, K) and inner structure (H, J, L). Scale bars represent 100 nm (D, E, F) and 50 nm (G-L).

therapeutic proteins such as osteoinductive BMP2 and BMP9 [47]. ELISA quantification confirmed the synthesis of correctly folded BMP proteins after mRNA transfection with LFM and LYX lipoplexes in both human HEK293 cells and rMSC. Although overall BMP protein production was higher with LFM than with LYX, it still depended on both the RNA molecule and the cell type. While rMSCs produced little to no BMP2 regardless of the vector, they produced significant amounts of BMP9 with LFM but none with LYX. Additionally, HEK293 cells, which are more transfection-permeable than primary rMSCs, produced 6-fold

more BMP2 with LFM than with LYX, but produced comparable amounts of BMP9 with both vectors (Fig. 5A and B). To confirm lipoplex bioactivity, C2C12-BRE/LUC cells (Fig. 5C), were transfected with increasing doses of cmhBMP-2 and cmhBMP-9 mRNA [39]. The luciferase activity in C2C12-BRE/LUC cells increased proportionally with higher doses of recombinant proteins and mRNA, except for rhBMP9 (Fig. 5D). Notably, transfection with 20 pg/cell induced luciferase activity equivalent to approximately 100 ng/mL of BMP2 with LFM, and 30–40 ng/mL of BMP2 with LYX (Fig. 5D and E).

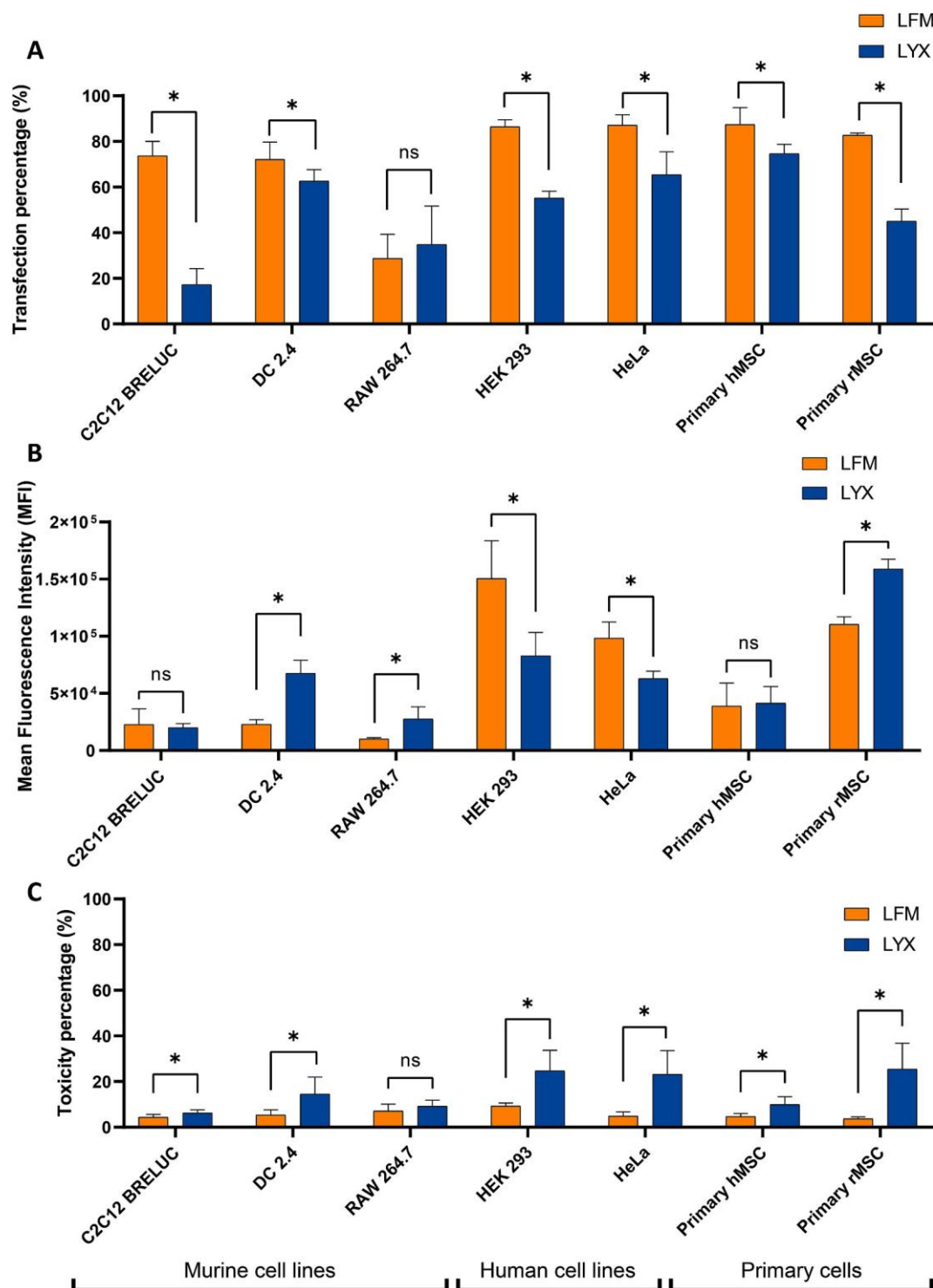


Fig. 4. LYX and LFM transfection efficacy on various murine and human cell types. (A) Transfection rates, (B) mean fluorescence intensity per cell, and (C) toxicity percentage ($n = 3$) 24 h post-transfection using 10 μ g of EGFP cmRNA per cell. Values are represented as mean + SD. Mann-Whitney statistical test was used (*) $p < 0.05$.

3.5. Comparison of LYX and LFM transfection mechanisms

To further understand the differences in transfection efficiency between LYX and LFM (Figs. 4 and 5), we analyzed and compared the cellular uptake and intracellular trafficking of these two delivery systems. C2C12-BRE/LUC cells were transfected with LYX or LFM complexed with Cy3-labelled mRNA and observed by confocal microscopy (Fig. 6).

A transfection control using free mRNA showed minimal cell internalization with 1.0 % and 4.2 % of the labelled mRNA taken up by cells at both 4 h and 24 h post-transfection, respectively. The proportion of cells with internalized labelled complexes was lower when mRNA was complexed with LYX than when complexed with LFM (77 % versus 96 %) 4 h post-transfection. However, this difference was reduced (93 % for LYX versus 99 % for LFM) 24 h post-transfection (Fig. 6A). These results indicated different internalization kinetics for the two types of

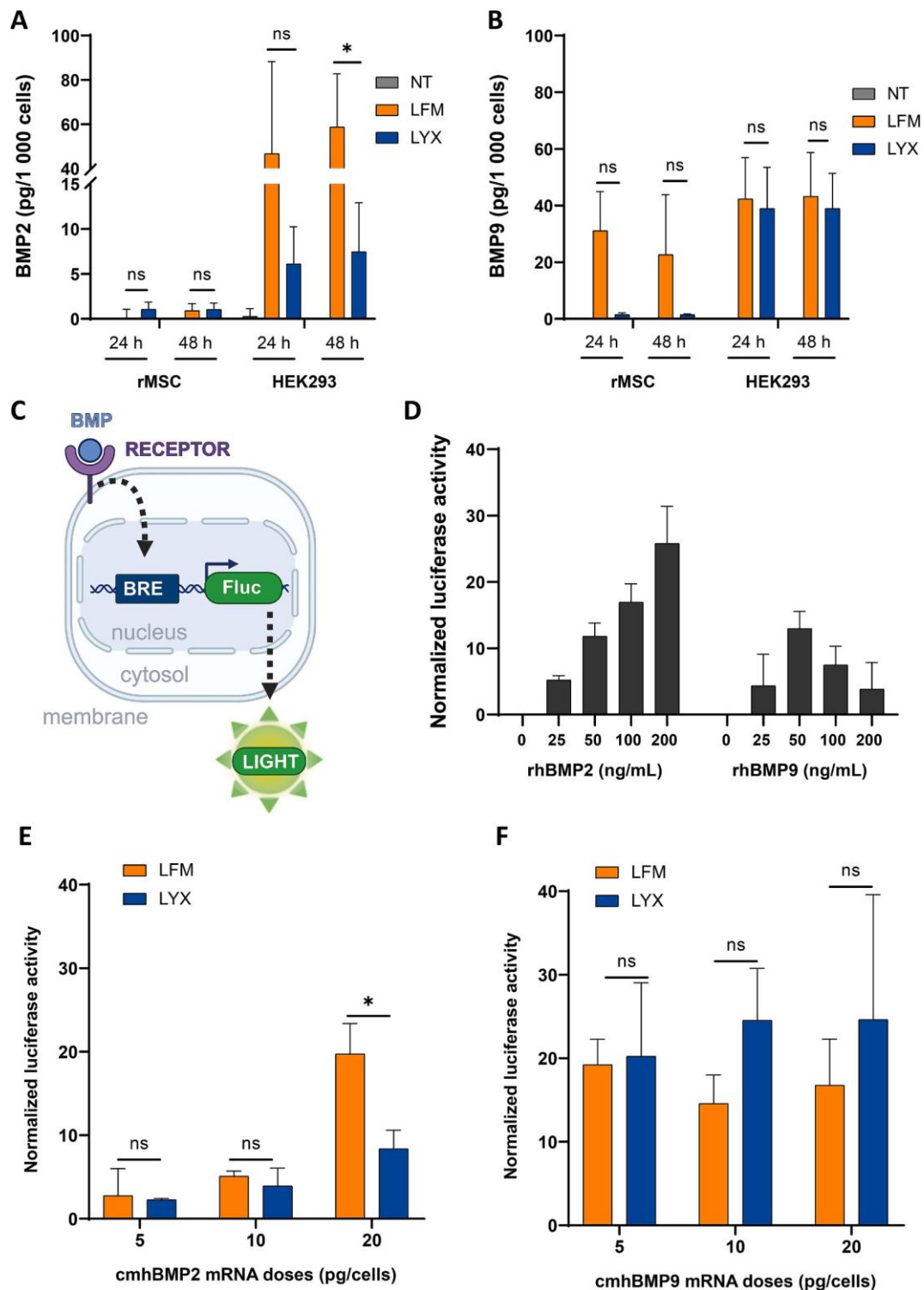


Fig. 5. Production of bioactive hBMP2 and hBMP9. (A) hBMP2 and (B) hBMP9 levels secreted by HEK293 and rMSC cells transfected with LFM or LYX lipoplexes containing cmRNA encoding hBMP-2 or hBMP-9. (C) Schematic representation of the BMP signaling activation pathway in C2C12-BRE/LUC cells, leading to firefly luciferase expression. (D) Quantification of the luciferase activity of C2C12-BRE/Luc cells treated with increasing doses of recombinant hBMP-2 or recombinant hBMP-9. (E) Quantification of the luciferase activity of C2C12-BRE/Luc cells transfected with increasing doses of LFM or LYX lipoplexes containing cmhBMP-2 or (F) cmhBMP-9 mRNA ($n = 3$). Values are represented as mean + SD. Two-way ANOVA statistical test was used (*) $p < 0.05$.

complexes into the cells, with LYX lipoplexes being internalized more slowly than LFM complexes. In addition, the subcellular trafficking of internalized complexes was analyzed 1 h and 4 h post-transfection using confocal microscopy. Although Rab7 is also present in lysosomes, endosomal complexes were

pre-labelled with EGFP-Rab5, EGFP-Rab7, EGFP-Rab11 and EGFP-Rab27 fusion proteins to detect early endosomes, late endosomes, recycling endosomes, and secretory vesicles, respectively (Fig. 6B) [48–50]. Pearson's colocalization coefficients and representative confocal image are presented in Fig. 6C, D, E and F.

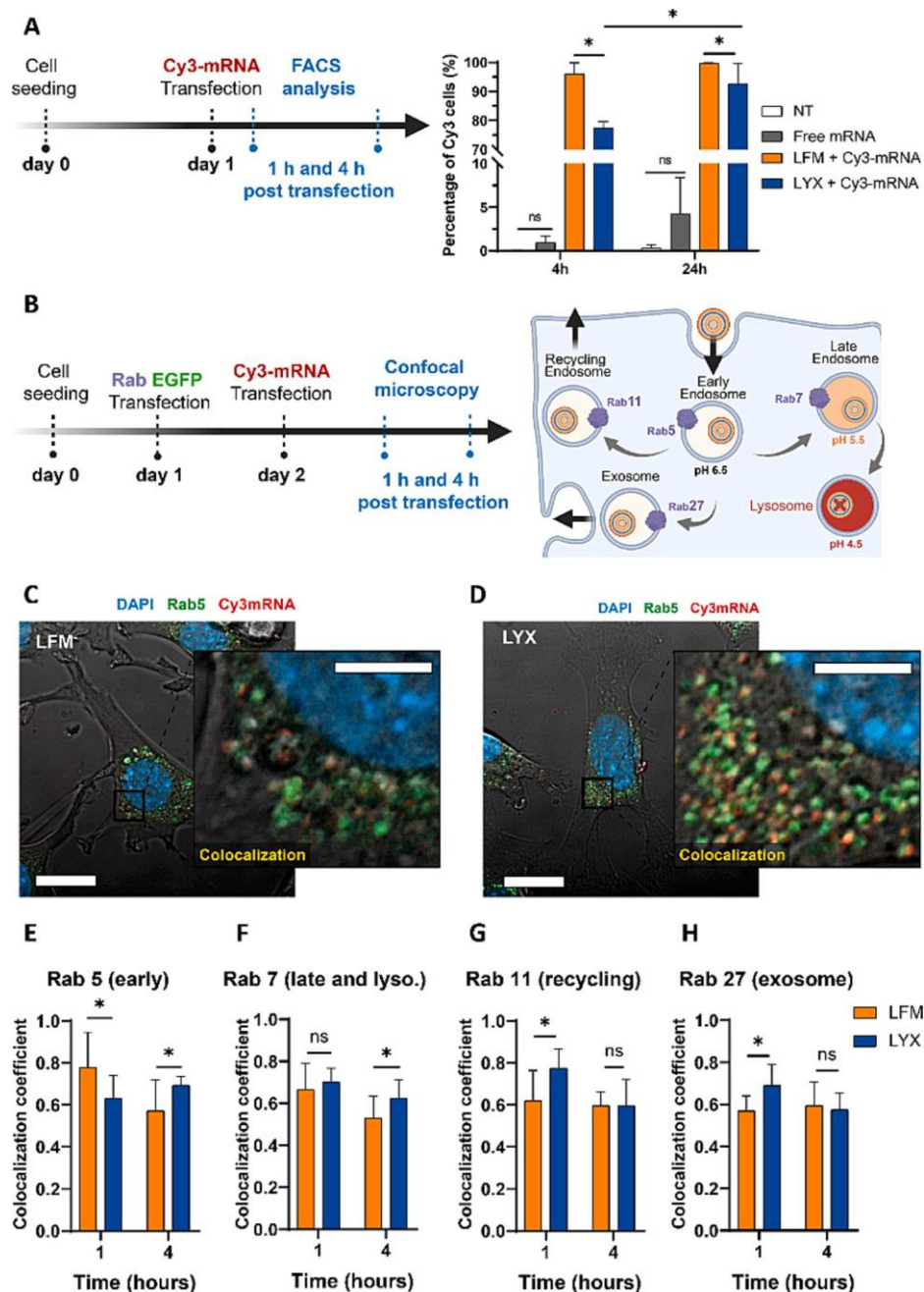


Fig. 6. Cellular uptake and intracellular trafficking analyses. (A) Percentage of Cy3-positive C2C12-BRE/LUC cells 4 h or 24 h post-transfection with LFM or LYX transfection reagent. Values are represented as mean + SD. Two-way ANOVA statistical test was used (*) $p < 0.05$. (B) Diagram illustrating endosomal trafficking following lipoplex uptake. Confocal microscopy images of cells labelled with Rab5-EGFP fusion protein, 4 h post-transfection with LFM-Cy5 mRNA (C) or LYX-Cy5 mRNA labelled complexes (D) (scale bar = 20 μ m or 5 μ m for zoomed images). (E) Coefficient of colocalization of Cy3 mRNA-containing LYX or LFM lipoplexes with EGFP-labelled Rab5, (F) Rab7, (G) Rab11 and (H) Rab27 proteins in C2C12-BRE/LUC cells. Values are represented as mean + SD. Student's statistical test was used (*) $p < 0.05$.

Results showed that 1 h post-transfection, the number of LYX lipoplexes in early Rab5 endosomes was lower than that of LFM complexes. However, from 4 h post-transfection, the number of LYX lipoplexes increased over time and became higher than that of LFM (Fig. 6C), confirming the effective uptake of LYX lipoplexes, but with slower kinetics than with LFM lipoplexes. Both LYX and LFM complexes were observed to be routed towards Rab7 endosomes, recycling Rab11 endosomes, and Rab27 exocytosis compartments (Fig. 6D, E and F). These data suggested that LYX lipoplexes escape endosome, for mRNA release, more slowly than LFM complexes and, were more susceptible to exocytosis.

3.6. Transfection efficacy of lipoplexes in hydrogels in vitro and in vivo

To assess the suitability of lipoplexes for therapeutic applications, they were incorporated into a fibrin hydrogel, which is recognized for its biocompatibility, ease of preparation and use, ability to mimic the natural extracellular matrix, and most importantly, good degradability in vivo [51,52].

The transfection efficacy was first assessed in an in vitro 3D model comprising either LFM or LYX complexes prepared with Fluc-mRNA mixed with rMSCs into fibrin gels. The bioluminescence signal of gels containing each of the two types of lipoplexes decreased with the

incubation time and reached background levels after 72 h. It is interesting to note that, albeit not significant, LYX-containing gels showed a trend towards a higher bioluminescence signal than LFM gels (Fig. 7A).

Finally, the LYX lipoplexes-loaded fibrin hydrogels were implanted subcutaneously in mice to evaluate the in vivo capability of local mRNA production in vivo. The kinetic of FLuc expression was similar to in vitro with the 3D models, with a decrease in bioluminescence signal from 24 h to 48 h after implantation (Fig. 7B). Noteworthy, 24 h after implantation, gels complexed with LYX induced significantly higher bioluminescence than those complexed with LFM.

4. Discussion

Liposomes are a promising delivery system for mRNA therapy supported by numerous preclinical studies and ongoing clinical vaccine development. Liposome dispersity and stability represents a critical challenge for mRNA delivery. In fact, variable size results in poly-disperse mRNA lipoplexes solution, which can lead to inconsistent mRNA encapsulation and delivery, variable cellular uptake and stability issues.

4.1. LYX is an optimized version of Lip100 liposomes for mRNA delivery

In this study, we report an optimized version of “Lip100” liposomes, designed LYX for enhanced mRNA delivery [20,21]. Both liposomes have the same lipid composition with equal amounts of the KLN25 cationic lipid, which enables mRNA complexation, and the MM27 ionizable lipid, which ensures endosome escape [23]. However, LYX liposomes possess an improved preparation process with a lyophilization and an extrusion step. The implementation of a lyophilization step in the preparation of LYX liposomes enabled the production of large volume batches (5 to 10 mL) which can be stored at -20°C for at least 6 months after lyophilization, without altering their structures or

performances. Compared to the preparation of Lip100 liposomes, which exhibit a PDI of ~ 0.3 , the introduction of an extrusion step in the LYX formulation resulted in monodisperse liposomes with a size of 150 nm and a reduced PDI of ~ 0.1 , which is considered optimal for mRNA delivery. Liposome size and size distribution are considered as critical quality attributes for achieving optimal cell transfection. A size range of 50 to 200 nm is generally considered optimal for most drug delivery applications, while the PDI of 0.1 to 0.3 reflects a consistent and uniform size distribution, which is essential for ensuring reliable performance and predictable behavior [26].

After reconstitution and extrusion, LYX liposomes can be stored at 4°C for 12 months without any changes in size or homogeneity, which was not the case with Lip100 (Fig. 2C and D). Consequently, LYX transfection efficacy (percentage of transfected cells) remained high and stable during liposomes storage (from 79 % to 73 %). However, their ability to encapsulate mRNA decreased (from 95 % to 70 % between the 2nd and 12th month of storage) with a concomitant decrease in the mean fluorescence intensity (MFI) of transfected cell (Fig. 2E). A decrease in encapsulation efficiency suggests that fewer mRNA copies per lipoplex were encapsulated and delivered to cells, explaining the loss of MFI.

Additionally, the formulation process allows a high formulation reproducibility that is essential to obtain reliable results. Moreover, the LYX lipoplexes do not aggregate, even in the presence of serum (Fig. 2B), and protect mRNA from RNase degradation (Fig. 1D). All these features suggest a strong potential of LYX as a vector for in vivo mRNA delivery [6,53].

4.2. Morphological reorganization of LYX lipoplexes according to pH acidification

Once lipoplexes enters the cells, endosomal trafficking induces vesicle acidification ([54], illustration Fig. 6B). Our study reports a

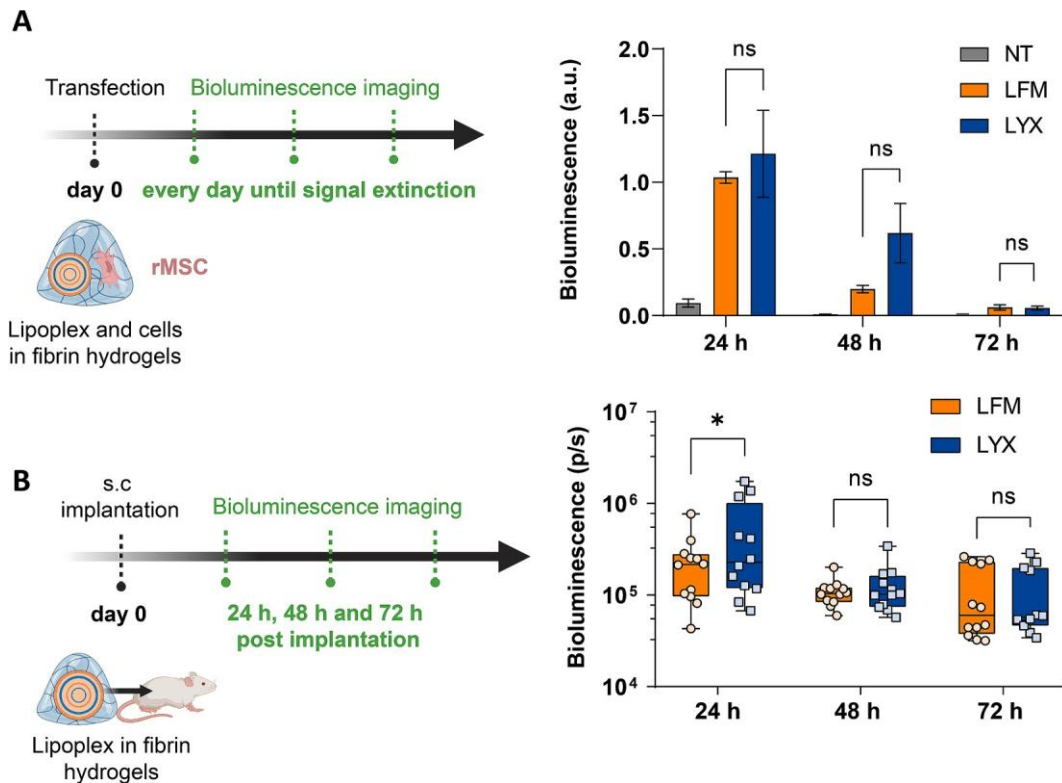


Fig. 7. In cellulo and in vivo LYX lipoplexes delivery embedded in fibrin hydrogel using Fluc-mRNA. (A) Bioluminescence measured after rMSC transfection using LYX or LFM hydrogels using Fluc-mRNA. (B) Bioluminescence kinetic after subcutaneous implantation of LYX-mRNA or LFM-mRNA embedded in fibrin hydrogels. Values are represented as mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA statistical test was used (*) $p < 0.05$.

detailed analysis of lipoplex morphology reorganization under acidic condition, using SAXS and cryo-TEM in tandem to characterize and track structural changes.

On the one hand, SAXS and cryo-TEM analysis performed at neutral pH showed that, in absence of mRNA, LYX liposomes exhibited a spherical morphology (Fig. 1C) with an unilamellar structure (Fig. 3A) [55–57]. In contrast, LYX lipoplexes complexed with mRNA exhibited a single peak on SAXS curves (Fig. 3A) and a multilamellar structure on cryo-TEM images, confirming complexation between cationic lipids and anionic mRNA molecules (Fig. 1C) [59,60,62]. Both techniques indicated a 5–6 nm interlamellar spacing between the lipid bilayers, in agreement with values observed in others reports [46,55,58] [58–60]. On the other hand, SAXS analysis performed under acidic conditions to mimic the microenvironment encountered during endosomal trafficking showed the appearance of a second peak at pH 6.0 and below (Fig. 3B and C). This suggests a structural transition of LYX lipoplexes in a pH range corresponding to endosomal trafficking [46], a phenomenon already reported with mRNA LNPs [61,62]. The appearance of the second peak at a pH value below MM27 ionizable lipid pKa (~6.2) suggests that the first peak corresponds to mRNA interaction with the cationic KLN25 lipids, while the second peak reflects mRNA interaction with protonated MM27 lipid (Fig. 3B and C). MM27, which contains an imidazole moiety, becomes protonated at low pH [19,63–66], supporting our hypothesis. In the cryo-TEM images, as the pH decreases, the edges of the lipoplexes change from clear to blurred (Fig. 3G, I and K), with a hollow structure clearly visible at pH 4.5 (Fig. 3K), similar to the findings reported by [67].

Based on these results, we hypothesize that endosome acidification triggers a chain reaction that enhances mRNA release into the cytosol. First, acidification progressively increases the proportion of cationic MM27, which facilitates electrostatic interaction with mRNA such as KLN25 (Fig. 3C). Second, the stepwise protonation of lipids leads to an excess of positive charges, leading in an imbalanced distribution of lipids on the lipoplex surface and resulting in a hollow structure (Fig. 3I and K). We propose that this hollow structure, composed of cationic lipids, favors electrostatic interactions with the negatively charged endosome membrane, ultimately leading to endosome destabilization and mRNA release.

4.3. LYX liposomes are effective vectors for mRNA delivery both *in vitro* and *in vivo*

We demonstrated, in the present study, the ability of LYX liposomes to deliver mRNA in a variety of cellular models and *in vivo* when loaded in hydrogels.

LYX successfully delivered EGFP reporter gene mRNA in a wide range of cell lines and primary cells (Fig. 4). However, the transfection efficiency of LYX was lower than that of the commercial gold standard Lipofectamine MessengerMAX™ (LFM), up to 60 % fewer transfected cells in C2C12 cells. LFM has been established as a commercial solution for mRNA delivery in hard-to transfect cells such as human induced pluripotent stem cells and peripheral blood mononuclear cells [68,69]. A key finding was the high transfection of human MSC with both LFM (82 % transfected cells) and LYX (70 % transfected cells), which is particularly desirable for therapeutic mRNA applications. However, a limitation of LYX was its observed cytotoxicity, with up to 25 % cell mortality in cell lines and primary cells compared to a maximum of 10 % for LFM (Fig. 4C). Although not assessed in the present study, the higher cytotoxicity with LYX can be attributed to its weak biodegradability, a known issue reported with the first generation lipids used in LNPs [70].

The potential of LYX in delivering mRNA of therapeutic protein production was confirmed using mRNA encoding the osteoinductive BMP2 and BMP9 growth factors for bone regeneration. LYX successfully produced BMP2 and BMP9 proteins in rat MSC and HEK293 cells (Fig. 5A and B) though at lower levels compared to LFM, consistent with cell transfection analysis (Figs. 4 and 6). The proteins produced by LYX

lipoplexes are functional, as evidenced by a dose-dependent induction of BMP signaling in C2C12-BRE/Luc cells (Fig. 6E), similar to the induction observed with recombinant human BMP2 and BMP9 proteins. Also, our results have shown that HEK293 cells produced more BMPs, overall, than primary rat MSCs. These observations are consistent with the frequent use of HEK293 cells in bioproduction due to their high transfection rate and ability to rapidly produce protein in a stable and abundant manner [71,72].

A comprehensive analysis of the cellular uptake and intracellular trafficking was conducted to better understand the differences in transfection efficacy between LYX and LFM (Figs. 4, 5 and 6). The results revealed two major differences in the cellular processing of LYX mRNA complexes compared to LFM mRNA complexes. First, LYX complexes were internalized more slowly into cells (Fig. 6A) and exhibited lower escape from Rab5 endosomes (Fig. 6C). A recent study reported that endosomal escape of mRNA LNP occurs during the first 2 h after transfection mainly from Rab5 endosomes [73]. This is in agreement with our findings and suggests improving Rab5 endosomal escape as a promising approach to increase the efficiency of mRNA delivery. Second, LYX complexes were more susceptible to exocytosis by translocation into the Rab11 recycling and Rab27 secretory compartments. We noted a lack of correlation between intracellular delivery of mRNA quantitated using Cy3-labelled mRNA (Fig. 6A) and expression degree of mRNA (Fig. 4). The lack of correlation between uptake and expression degree was also evidenced by Jiang et al. [74]. They quantified a higher correlation between Fluc reporter mRNA expression degree with endosomal escape than between Fluc expression degree and uptake.

Altogether, this suggests that LYX are less likely than LFM complexes to escape the endosome for mRNA release, resulting in a lower yield of mRNA translation [75]. Among them, incorporation of biodegradable groups in the vector formulation can facilitate their degradation, thus promoting particle disassembly after internalization [76]. In parallel, biomimetic strategies are being explored, combining nonviral delivery vectors with viral fusogenic peptides or bacterial toxins, potentially leading to more efficient mRNA delivery systems [77].

Given the significant potential of mRNA for directing the synthesis of therapeutic proteins for tissue repair and regeneration, we evaluated the efficacy of LYX liposomes compared to LFM for mRNA delivery within an implantable hydrogel matrix commonly used in tissue engineering approaches [51]. Lipoplexes were incorporated into a fibrin hydrogel, which offers numerous advantages as a delivery platform for bioactive molecules, particles, or cells, and supports tissue regeneration.

Interestingly, while the transfection potential of mRNA with LYX lipoplexes in rat MSCs *in vitro* was 2-fold lower than that of LFM under 2D conditions (cell culture in a monolayer) (Fig. 4A), it was similar in a 3D fibrin gel environment for 48 h of incubation (Fig. 7A). Advantageously, when the gels loaded with lipoplexes (without cells) were implanted subcutaneously in mice, LYX-loaded hydrogels induced higher luciferase expression during the first 24 h compared to LFM-loaded hydrogels (Fig. 7B). Overall, our results demonstrated that LYX liposomes are more efficient at mRNA delivery in a 3D environment compared to a 2D environment, especially in comparison to LFM.

5. Conclusion

Our study focused on characterizing and evaluating the therapeutic potential of LYX, an optimized version of the Lip100 liposomes, designed for nucleic acid delivery, previously reported. LYX are stable, monodisperse, and maintain their performances upon storage. Detailed analysis of LYX lipoplex morphology led us to hypothesize a pH-based mechanism for mRNA release into the cytosol triggered by acidification. Finally, analyses of cell transfection both *in vitro* and *in vivo* highlighted the limitations and advantages of the LYX liposomes, demonstrating its versatility as a platform for mRNA delivery.

CRedit authorship contribution statement

Albert Ngalle Loth: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Manon Maroquenne:** Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Ayoub Medjmedj:** Writing – review & editing, Methodology. **Franck Coste:** Validation, Formal analysis. **Thomas Bizien:** Validation, Resources, Investigation. **Chantal Pichon:** Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. **Delphine Logeart-Avramoglou:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition. **Federico Perche:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization.

Acknowledgments

The authors thank the P@CYFIC division of the MO2VING facility (CBM, Orléans, France), more particularly David Gosset. We also thank Julien Burlaud Gaillard and the Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique de l'Université de Tours for cryo-TEM studies. Then, we thank Céline Landon (CBM, Orléans) for lending us the extrusion apparatus.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (CREABONE Grant Number ANR-21-CE18-0037). SAXS studies were supported by Synchrotron SOLEIL (proposal # 20230060).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.010>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] Z. Kis, C. Kontoravdi, R. Shattock, N. Shah, Resources, production scales and time required for producing RNA vaccines for the global pandemic demand, *Vaccines* 9 (2020) 3.
- [2] D. Bitounis, E. Jacquinet, M.A. Rogers, M.M. Amiji, Strategies to reduce the risks of mRNA drug and vaccine toxicity, *Nat. Rev. Drug Discov.* 23 (2024) 281–300.
- [3] R.E. De La Vega, M. van Griensven, W. Zhang, M.J. Coenen, C.V. Nagelli, J. A. Panos, C.J. Peniche Silva, J. Geiger, C. Plank, C.H. Evans, Efficient healing of large osseous segmental defects using optimized chemically modified messenger RNA encoding BMP-2, *Sci. Adv.* 8 (2022) eabl6242.
- [4] A.J. Barbier, A.Y. Jiang, P. Zhang, R. Wooster, D.G. Anderson, The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies, *Nat. Biotechnol.* (2022) 1–15.
- [5] J. Kim, Y. Eyeris, M. Gupta, G. Sahay, Self-assembled mRNA vaccines, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170 (2021) 83–112.
- [6] S. Uchida, F. Perche, C. Pichon, H. Cabral, Nanomedicine-based approaches for mRNA delivery, *Mol. Pharm.* 17 (2020) 3654–3684.
- [7] P. Wang, F. Perche, D. Logeart-Avramoglou, C. Pichon, RNA-based therapy for osteogenesis, *Int. J. Pharm.* 569 (2019) 118594.
- [8] O. Chabanovska, A.-M. Galow, R. David, H. Lemcke, mRNA—A game changer in regenerative medicine, cell-based therapy and reprogramming strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 179 (2021) 114002.
- [9] K. Kariko, H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, D. Weissman, mRNA is an endogenous ligand for toll-like receptor 3, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12542–12550.
- [10] K. Kariko, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, Suppression of RNA recognition by toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA, *Immunity* 23 (2005) 165–175.
- [11] C. Pichon, F. Perche, Design and delivery of messenger RNA-based vaccines, *Biochemistry* 43 (2021) 4–7.
- [12] C. Delehedde, L. Even, P. Midoux, C. Pichon, F. Perche, Intracellular routing and recognition of lipid-based mRNA nanoparticles, *Pharmaceutics* 13 (2021) 945.
- [13] R. Tenchov, R. Bird, A.E. Curtze, Q. Zhou, Lipid nanoparticles— from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement, *ACS Nano* 15 (2021) 16982–17015.

- [14] J. Szebeni, G. Storm, J.Y. Ljubimova, M. Castells, E.J. Phillips, K. Turjeman, Y. Barenholz, D.J. Crommelin, M.A. Dobrovolskaia, Applying lessons learned from nanomedicines to understand rare hypersensitivity reactions to mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines, *Nat. Nanotechnol.* 17 (2022) 337–346.
- [15] R.W. Malone, P.L. Felgner, I.M. Verma, Cationic liposome-mediated RNA transfection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 6077–6081.
- [16] G. Gregoriadis, Liposomes and mRNA: two technologies together create a COVID-19 vaccine, *Med. Drug Discov.* 12 (2021) 100104.
- [17] S. Grabbe, H. Haas, M. Diken, L.M. Kranz, P. Langguth, U. Sahin, Translating nanoparticle-personalized cancer vaccines into clinical applications: case study with RNA-lipoplexes for the treatment of melanoma, *Nanomedicine* 11 (2016) 2723–2734.
- [18] Z. Cheng, A. Al Zaki, J.Z. Hui, V.R. Muzykantov, A. Tsourkas, Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities, *Science* 338 (2012) 903–910.
- [19] F. Perche, D. Gosset, M. M'el, M.-L. Miramon, J.-J. Yaouanc, C. Pichon, T. Benveniste, P.-A. Jaffre's, P. Midoux, Selective gene delivery in dendritic cells with mannyslated and histidylated lipopolyplexes, *J. Drug Target.* 19 (2011) 315–325.
- [20] S. Akhter, M. Berchel, P.-A. Jaffre's, P. Midoux, C. Pichon, mRNA Lipoplexes with cationic and ionizable α -amino-lipophosphonates: membrane fusion, transfection, mRNA translation and conformation, *Pharmaceutics* 14 (2022) 581.
- [21] M. M'el, G. Breuzard, J.J. Yaouanc, J.C. Clement, P. Lehn, C. Pichon, P.A. Jaffre's, P. Midoux, Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: high efficiency of an imidazolium derivative, *ChemBioChem* 9 (2008) 1462–1471.
- [22] M. M'el, C. Neveu, C. Goncalves, J.-J. Yaouanc, C. Pichon, P.-A. Jaffre's, P. Midoux, Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays, *Chem. Commun.* (2008) 3124–3126.
- [23] P. Wang, F. Perche, P. Midoux, C.S. Cabral, V. Malard, I.J. Correia, E.-H. Hanane, H. Petite, D. Logeart-Avramoglou, C. Pichon, In vivo bone tissue induction by freeze-dried collagen-nanohydroxyapatite matrix loaded with BMP2/NS1 mRNAs lipopolyplexes, *J. Control. Release* 334 (2021) 188–200.
- [24] C. Delehedde, I. Ciganek, N. Rameix, N. Laroui, C. Goncalves, L. Even, P. Midoux, C. Pichon, Impact of net charge, targeting ligand amount and mRNA modification on the uptake, intracellular routing and the transfection efficiency of mRNA lipopolyplexes in dendritic cells, *Int. J. Pharm.* 647 (2023) 123531.
- [25] C. Goncalves, S. Akhter, C. Pichon, P. Midoux, Intracellular availability of pDNA and mRNA after transfection: a comparative study among polyplexes, lipoplexes, and lipopolyplexes, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 3153–3163.
- [26] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipid nanocarrier systems, *Pharmaceutics* 10 (2018) 57.
- [27] S. Chen, Y.Y.C. Tam, P.J. Lin, M.M. Sung, Y.K. Tam, P.R. Cullis, Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA, *J. Control. Release* 235 (2016) 236–244.
- [28] A. Choudhury, M. Dominguez, V. Puri, D.K. Sharma, K. Narita, C.L. Wheatley, D. L. Marks, R.E. Pagano, Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-pick C cells, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1541–1550.
- [29] Z. Fang, N. Takizawa, K.A. Wilson, T.C. Smith, A. Delprato, M.W. Davidson, D. G. Lambright, E.J. Luna, The membrane-associated protein, supravillin, accelerates F-actin-dependent rapid integrin recycling and cell motility, *Traffic* 11 (2010) 782–799.
- [30] W. Westbroek, M. Tuchman, B. Tinloy, O. De Wever, T. Vilboux, J.M. Hertz, H. Hasle, C. Heilmann, A. Helip-Wooley, R. Kleta, A novel missense mutation (G43S) in the switch I region of Rab27A causing Griscelli syndrome, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 248–254.
- [31] S. Kashiwagi, Y. Fujioka, A.O. Satoh, A. Yoshida, M. Fujioka, P. Nepal, A. Tsuzuki, O. Aoki, S. Paudel, H. Sasajima, Folding latency of fluorescent proteins affects the mitochondrial localization of fusion proteins, *Cell Struct. Funct.* 44 (2019) 183–194.
- [32] X. Xia, Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines, *Vaccines* 9 (2021) 734.
- [33] O. Shimomura, Discovery of green fluorescent protein (GFP)(Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 5590–5602.
- [34] V. Rosen, BMP2 signaling in bone development and repair, *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 (2009) 475–480.
- [35] M. Kuschel, Analysis of Messenger RNA Using the Agilent 2100 Bioanalyzer and the RNA 6000 LabChip® Kit, Application Note, 2000.
- [36] F. Perche, R. Clemençon, K. Schulze, T. Ebensen, C.A. Guzman, C. Pichon, Neutral lipopolyplexes for in vivo delivery of conventional and replicative RNA vaccine, *Mol. Ther.—Nucleic Acids* 17 (2019) 767–775.
- [37] A. Medjmedj, A. Ngalle-Loth, R. Clemençon, J. Hamacek, C. Pichon, F. Perche, In Cellulo and in vivo comparison of cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for lipid nanoparticle formulation of mRNA, *Nanomaterials* 12 (2022) 2446.
- [38] Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K.L. Rock, Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules, *J. Immunol.* 158 (1997) 2723–2730.
- [39] D. Logeart-Avramoglou, M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, H. Petite, An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct, *Anal. Biochem.* 349 (2006) 78–86.

- [40] K. Song, M. Huang, Q. Shi, T. Du, Y. Cao, Cultivation and identification of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Mol. Med. Rep.* 10 (2014) 755–760.
- [41] A. Moya, N. Larochette, M. Bourguignon, H. El-Hafci, E. Potier, H. Petite, D. Logeart-Avramoglou, Osteogenic potential of adipogenic predifferentiated human bone marrow-derived multipotent stromal cells for bone tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12 (2018) e1511–e1524.
- [42] L.C. Crowley, A.P. Scott, B.J. Marfell, J.A. Boughaba, G. Chojnowski, N. J. Waterhouse, Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry, *Cold Spring Harb Protoc* 2016 (2016) prot087163.
- [43] P. Becquart, A. Cambon-Binder, L.-E. Monfoulet, M. Bourguignon, K. Vandamme, M. Bensidhoum, H. Petite, D. Logeart-Avramoglou, Ischemia is the prime but not the only cause of human multipotent stromal cell death in tissue-engineered constructs in vivo, *Tissue Eng. Part A* 18 (2012) 2084–2094.
- [44] L.-E. Monfoulet, P. Becquart, D. Marchat, K. Vandamme, M. Bourguignon, E. Pacard, V. Viateau, H. Petite, D. Logeart-Avramoglou, The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs, *Tissue Eng. Part A* 20 (2014) 1827–1840.
- [45] M. Ongun, A.G. Lokras, S. Baghel, Z. Shi, S.T. Schmidt, H. Franzzyk, T. Rades, F. Sebastiani, A. Thakur, C. Foged, Lipid nanoparticles for local delivery of mRNA to the respiratory tract: effect of PEG-lipid content and administration route, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 198 (2024) 114266.
- [46] L. Uebbing, A. Ziller, C. Siewert, M.A. Schroer, C.E. Blanchet, D.I. Svergun, S. Ramishetti, D. Peer, U. Sahin, H. Haas, Investigation of pH-responsiveness inside lipid nanoparticles for parenteral mRNA application using small-angle X-ray scattering, *Langmuir* 36 (2020) 13331–13341.
- [47] B. Khorsand, S. Elangovan, L. Hong, A. Dewerth, M.S. Kormann, A.K. Salem, A comparative study of the bone regenerative effect of chemically modified RNA encoding BMP-2 or BMP-9, *AAPS J.* 19 (2017) 438–446.
- [48] G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 857–902.
- [49] M. Ostrowski, N.B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C.F. Moita, K. Schauer, A.N. Hume, R.P. Freitas, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 19–30.
- [50] B. Sönnichsen, S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, M. Zerial, Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 901–914.
- [51] R. Zhong, S. Talebian, B.B. Mendes, G. Wallace, R. Langer, J. Conde, J. Shi, Hydrogels for RNA delivery, *Nat. Mater.* 22 (2023) 818–831.
- [52] R. Sanz-Horta, A. Matesanz, A. Gallardo, H. Reinecke, J.L. Jorcano, P. Acedo, D. Velasco, C. Elvira, Technological advances in fibrin for tissue engineering, *J. Tissue Eng.* 14 (2023) 20417314231190288.
- [53] U. Sahin, K. Kariko, Ö. Türeci, mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 759–780.
- [54] P.R. Cullis, M.J. Hope, Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies, *Mol. Ther.* 25 (2017) 1467–1475.
- [55] A. Aljabbari, A.G. Lokras, J.J.K. Kirkensgaard, T. Rades, H. Franzzyk, A. Thakur, Y. Zhang, C. Foged, Elucidating the nanostructure of small interfering RNA-loaded lipidoid-polymer hybrid nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 633 (2023) 907–922.
- [56] X. Zhang, K. Men, Y. Zhang, R. Zhang, L. Yang, X. Duan, Local and systemic delivery of mRNA encoding survivin-T34A by lipoplex for efficient colon cancer gene therapy, *Int. J. Nanomedicine* 14 (2019) 2733.
- [57] C.D. Siewert, H. Haas, V. Cornet, S.S. Nogueira, T. Nawroth, L. Uebbing, A. Ziller, J. Al-Gousous, A. Radulescu, M.A. Schroer, Hybrid biopolymer and lipid nanoparticles with improved transfection efficacy for mRNA, *Cells* 9 (2020) 2034.
- [58] A. Pratsinis, Y. Fan, M. Portmann, M. Hammel, P. Kou, A. Sarode, P. Ringler, L. Kovacic, M.E. Lauer, J. Lamerz, Impact of non-ionizable lipids and phase mixing methods on structural properties of lipid nanoparticle formulations, *Int. J. Pharm.* 637 (2023) 122874.
- [59] J.W. Meisel, G.W. Gokel, A simplified direct lipid mixing lipoplex preparation: comparison of liposomal, dimethylsulfoxide, and ethanol-based methods, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27662.
- [60] S. Weisman, D. Hirsch-Lerner, Y. Barenholz, Y. Talmon, Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes, *Biophys. J.* 87 (2004) 609–614.
- [61] H. Yu, A. Angelova, B. Angelov, B. Dyett, L. Matthews, Y. Zhang, M. El Mohamad, X. Cai, S. Valimehr, C.J. Drummond, Real-time pH-dependent self-assembly of ionizable lipids from COVID-19 vaccines and in situ nucleic acid complexation, *Angew. Chem.* 135 (2023) e202304977.
- [62] J. Philipp, A. Dabkowska, A. Reiser, K. Frank, R. Krzyszton, C. Brummer, B. Nickel, C.E. Blanchet, A. Sudarsan, M. Ibrahim, pH-dependent structural transitions in cationic ionizable lipid mesophases are critical for lipid nanoparticle function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120 (2023) e2310491120.
- [63] P. Midoux, C. Pichon, J.J. Yaouanc, P.A. Jaffre, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 166–178.
- [64] F. Perche, O. Lambert, M. Berchel, P.-A. Jaffre, C. Pichon, P. Midoux, Gene transfer by histidylated lipopolyplexes: a dehydration method allowing preservation of their physicochemical parameters and transfection efficiency, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 144–150.
- [65] C. Gonçalves, M. Berchel, M.-P. Gosselin, V. Malard, H. Cheradame, P.-A. Jaffre, P. Guegan, C. Pichon, P. Midoux, Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection, *Int. J. Pharm.* 460 (2014) 264–272.
- [66] L. Billiet, J.-P. Gomez, M. Berchel, P.-A. Jaffre, T. Le Gall, T. Montier, E. Bertrand, H. Cheradame, P. Guegan, M. Mével, Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipopolyplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line, *Biomaterials* 33 (2012) 2980–2990.
- [67] C. Chen, Y. Zhang, Z. Cao, D. Li, Y. Zhu, H. Jing, Y. Li, F. Li, C.F. Xu, X. Yang, Long-term storage stable vesicle-like nanoparticles of lipid and polymer for siRNA and mRNA-mediated Cancer immunotherapy, *Adv. Funct. Mater.* 2406101 (2024).
- [68] N.T. Jarzebska, J. Frei, S. Lauchli, L.E. French, E. Guenova, C. Gouttefangeas, T. M. Kündig, M. Mellett, S. Pascolo, Lipofection with synthetic mRNA as a simple method for T-cell immunomonitoring, *Viruses* 13 (2021) 1232.
- [69] H. Wang, X. Liu, X. Ai, K. Remant-Bahadur, T.A. Dick, B. Yan, T. Lu, X. Zhou, R. Luo, M. Liu, Safe and effective delivery of mRNA using modified PEI-based Lipopolymers, *Pharmaceutics* 15 (2023) 410.
- [70] M. Qiu, Y. Li, H. Bloomer, Q. Xu, Developing biodegradable lipid nanoparticles for intracellular mRNA delivery and genome editing, *Acc. Chem. Res.* 54 (2021) 4001–4011.
- [71] C.L. Chin, J.B. Goh, H. Srinivasan, K.I. Liu, A. Gowher, R. Shanmugam, H.L. Lim, M. Choo, W.Q. Tang, A.H.-M. Tan, A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin, *Sci. Rep.* 9 (2019) 16768.
- [72] E. Tan, C. Chin, Z. Lim, S. Ng, HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021) 796991.
- [73] J.M. Johansson, H. Du Rietz, H. Hedlund, H.C. Eriksson, E. Oude Blenke, A. Pote, S. Harun, P. Nordenfelt, L. Lindfors, A. Witttrup, Cellular and biophysical barriers to lipid nanoparticle mediated delivery of RNA to the cytosol, *bioRxiv* (2024), 2024.2005.2031.596627.
- [74] Y. Jiang, Q. Lu, Y. Wang, E. Xu, A. Ho, P. Singh, Y. Wang, Z. Jiang, F. Yang, G. T. Tietjen, Quantitating endosomal escape of a library of polymers for mRNA delivery, *Nano Lett.* 20 (2020) 1117–1123.
- [75] E.C. Wayne, C. Long, M.J. Haney, E.V. Batrakova, T.M. Leisner, L.V. Parise, A. V. Kabanov, Targeted delivery of siRNA lipopolyplexes to cancer cells using macrophage transient horizontal gene transfer, *Adv. Sci.* 6 (2019) 1900582.
- [76] M. Grau, E. Wagner, Strategies and mechanisms for endosomal escape of therapeutic nucleic acids, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 81 (2024) 102506.
- [77] D. Pei, M. Buyanova, Overcoming endosomal entrapment in drug delivery, *Bioconjug. Chem.* 30 (2018) 273–283.

Supplementary material

Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery

Albert Ngalle Loth¹, Manon Maroquenne², Ayoub Medjmedj¹, Franck Coste¹, Thomas Bizien⁵, Chantal Pichon^{3, 4}, Delphine Logeart-Avramoglou^{2*}, Federico Perche^{1*}

Affiliations :

¹ *Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS UPR4301, Orléans, France*

² *Université Paris Cité, CNRS, INSERM, ENVA, B3OA, 75010, Paris, France*

³ *Inserm UMS 55 ART ARNm and LI2RSO, Université d'Orléans, F-45100 Orléans*

⁴ *Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, F-75035 Paris, France*

⁵ *Université Paris-Saclay, Synchrotron Soleil, 91190, Saint-Aubin, France*

* Corresponding Authors:

Federico Perche, federico.perche@cnrs-orleans.fr +33 2 38 25 56 29

Delphine Logeart-Avramoglou, delphine.logeart@cnrs.fr, +33 1 57 27 85 63

Materials and Methods

CryoTEM images

The Lip100 and LYX liposomes structures were analyzed by cryo-TEM as previously described using a JEM-1400Plus electron microscope (Jeol, Japan) operating at 120 kV [1].

mRNA synthesis

Plasmids containing a T7 promoter, the 5'UTR of β -globin, and the 3'UTR of mtRNR1 and AES were used to produce the mRNA [2] encoding for the enhanced green fluorescent protein (EGFP) [3]. The RNA molecules containing an anti-reverse cap analog (ARCA) and a poly(A) tail were synthesized by IVT using the HighYield T7 RNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) with 35% 5-iodo-uridine and 7.5 % of 5-iodo-cytidine [4].

Cell culture

DC2.4 murine immune cells were a gift from Pr Kenneth L. Rock [5]. DC2.4 cells were cultured in RPMI 1640 medium, containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 1% antibiotics (Sigma).

C2C12-BRE/Luc cells containing a BMP-sensitive reporter gene were obtained after stable transfection with the BMP-responsive element (BRE) fused to the luciferase gene [6].

C2C12-BRE/luc cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 1% antibiotics (Sigma).

Primary human MSCs (hMSCs) were harvested from bone marrow from discarded bone tissue during routine bone surgery from 3 donors at the Lariboisière Hospital, Paris, France. The tissues were harvested with the respective donor's consent in accordance with the regulations of the Lariboisière Hospital. hMSCs were isolated from the bone marrow using a procedure as previously reported [7, 8].

In vitro transfection

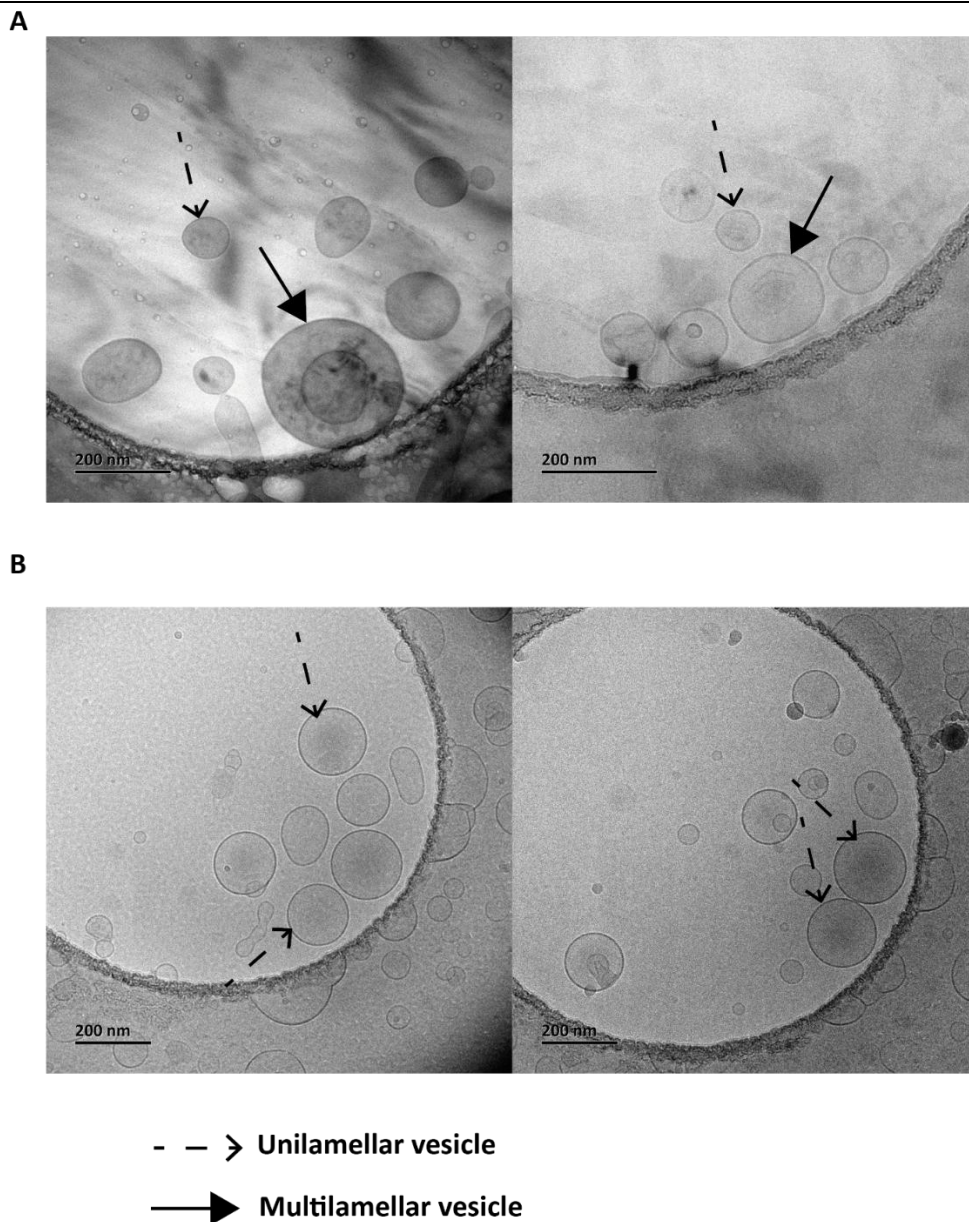
Cells at 70-80% confluence were transfected with 0.5 μ g of mRNA per well complexed with LYX. Transfection efficacy was assessed by flow cytometry 24 h after transfection using EGFP chemically modified mRNA (EGFP-cmRNA).

Toxicity-mediated cell death was assessed by adding propidium iodide (PI) to the samples prior to analysis (10 μ g/mL final concentration) [9]. Cell-associated fluorescence intensity was measured using a FORTESSA X20 flow cytometer with $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30$ nm for EGFP detection, and $\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 586 \pm 15$ nm for PI detection (Becton Dickinson). The fluorescence intensity was expressed as a mean fluorescence intensity (MFI) of 2,500 events for primary cells and 10,000 events for cell lines.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad software). All numerical data are expressed as mean + standard deviation (SD). The *t*-test (for normally distributed variables) or Mann-Whitney test was used to compare the means of two data groups. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the

means of more than two data groups. Experiments were performed in triplicate in three independent experiments. For all analyses, differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.



Supplementary Figure 1: CryoTEM images of LYX vs Lip100. (A) Lip100 liposomes. (B) LYX liposomes.

Concerning cryo-TEM images, lip100 exhibits both unilamellar and multilamellar vesicles, while only unilamellar vesicles were visible in LYX samples.

To evaluate the impact of storage on transfection efficacy, liposomes were stored at -20°C for 0, 1 or 15 months. Following rehydration and extrusion, the liposomes were formulated as lipoplexes to transfect DC2.4 cells with EGFP mRNA. After 24 h, transfected cells were analysed by flow cytometry. The results showed no loss of performance, with the mean fluorescence intensity remaining consistent across all storage durations.

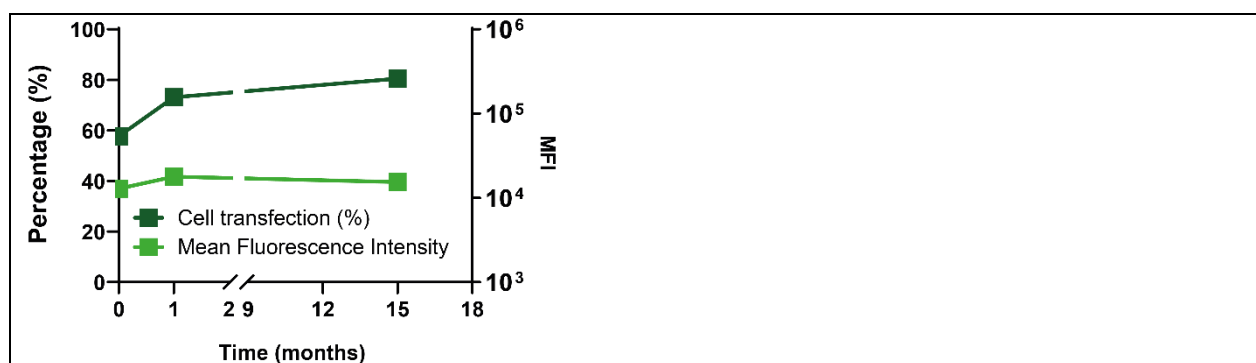


Figure S2: Liposome performance as a function of storage time at -20°C. Cell transfection (left axis) and MFI per cell (right axis) in DC2.4 cells after 24 h, using liposomes stored at -20°C for 0, 1 or 15 months, followed by rehydration and extrusion.

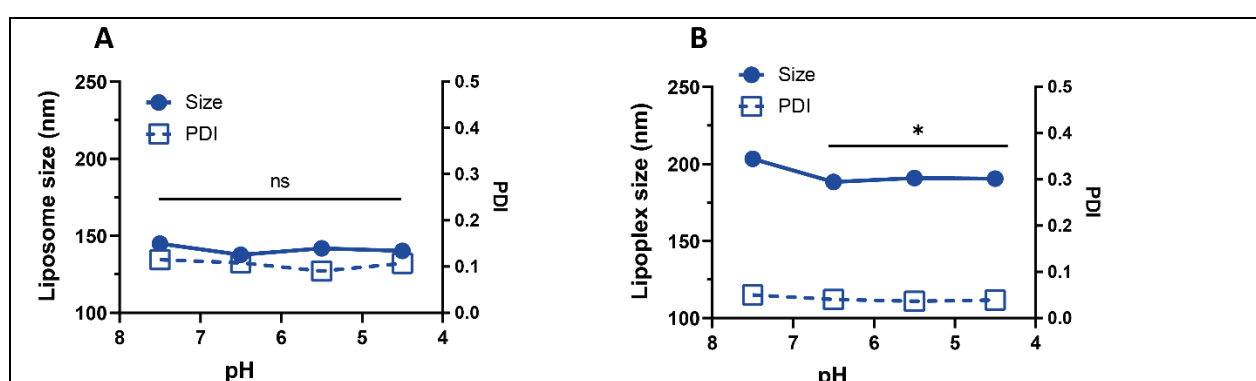
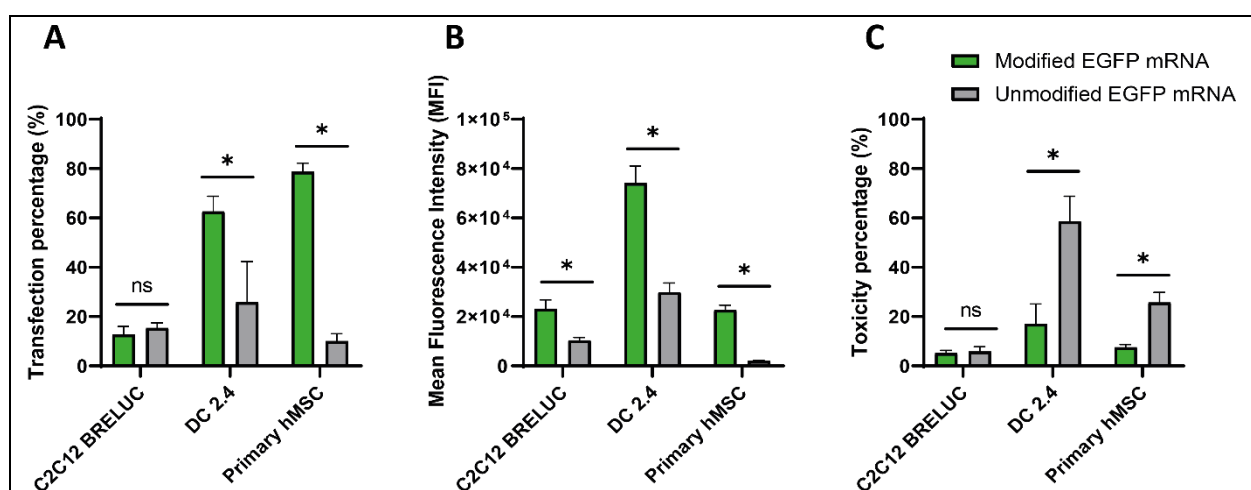


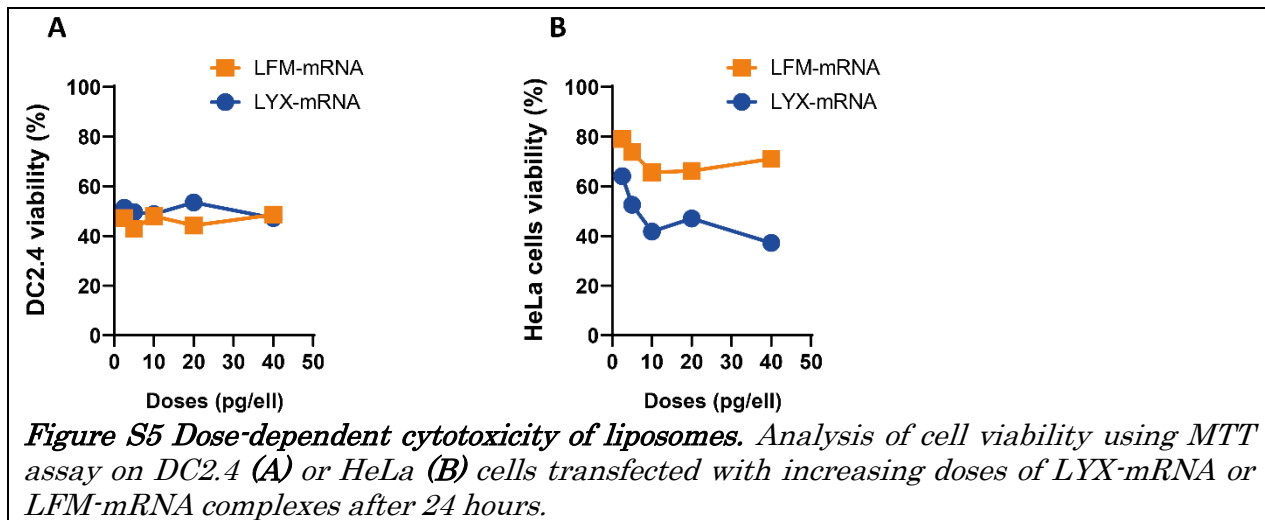
Figure S3: Liposome and lipoplex size and PDI as a function of pH. Liposome (A) and lipoplex (B) DLS analysis at a pH value of 7.5, 6.5, 5.5 and 4.5. One-way ANOVA statistical test was used (*) $p < 0.05$. Statistics analyses were performed in comparison with the 7.5 pH values.



Supplementary Figure 4: Transfection efficiency comparison of unmodified EGFP mRNA and modified EGFP mRNA (using 35% of iodo-Uridine and 7,5% or iodo Cytidine). (A), (B), (C) Transfection percentage, mean fluorescence intensity and toxicity percentage of unmodified and modified mRNA using LYX-mRNA lipoplexes.

The transfection percentage is significantly higher with modified mRNA in comparison

with unmodified EGFP mRNA on DC2.4 and primary human MSC. Also, modified EGFP is exhibited higher MFI independently of the three cell types. Finally, the use of modified mRNA is enhancing cell transfection, but also reducing cytotoxicity.



A dose-dependent MTT assay was performed with both vectors complexed with mRNA on DC2.4 and HeLa cells. The doses tested were 40, 20, 10, 5, 2.5 or 1.25 pg of mRNA per cell. As expected, cytotoxicity increased with the lipoplexes amount. In DC2.4 cells, both vectors exhibited similar viability percentages, around 50%. However, in HeLa cells, LYX induced a higher cytotoxicity than LFM in a dose-dependent manner.

References

1. Perche, F., et al., *Neutral lipopolyplexes for in vivo delivery of conventional and replicative RNA vaccine*. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2019. **17**: p. 767-775.
2. Xia, X., *Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines*. Vaccines, 2021. **9**(7): p. 734.
3. Shimomura, O., *Discovery of green fluorescent protein (GFP)(Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(31): p. 5590-5602.
4. De La Vega, R.E., et al., *Efficient healing of large osseous segmental defects using optimized chemically modified messenger RNA encoding BMP-2*. Science advances, 2022. **8**(7): p. eabl6242.
5. Shen, Z., et al., *Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1997. **158**(6): p. 2723-2730.
6. Logeart-Avramoglou, D., et al., *An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct*. Analytical biochemistry, 2006. **349**(1): p. 78-86.
7. Wang, P., et al., *In Vivo bone tissue induction by freeze-dried collagen-nanohydroxyapatite matrix loaded with BMP2/NS1 mRNAs lipopolyplexes*. Journal of Controlled Release, 2021. **334**: p. 188-200.
8. Moya, A., et al., *Osteogenic potential of adipogenic predifferentiated human bone marrow-derived multipotent stromal cells for bone tissue-engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2018. **12**(3): p. e1511-e1524.
9. Crowley, L.C., et al., *Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry*. Cold Spring Harbor Protocols, 2016. **2016**(7): p. pdb. prot087163.

DISCUSSION GENERALE

Les thérapies à base d'ARNm exploitent le mécanisme de traduction cellulaire pour produire des protéines thérapeutiques au sein de cellules d'intérêt. L'application de cette thérapie est déterminée par la protéine codée que l'on peut aisément changer ou modifier. Par conséquent, l'ARNm peut être employé dans de nombreux domaines thérapeutiques, comme la vaccination ou la médecine régénérative. Cependant, l'ARNm est faiblement internalisé par les cellules et est rapidement dégradé lorsqu'il est délivré seul. Pour ces raisons, depuis plusieurs dizaines d'années, des vecteurs, comme les LNP et les liposomes, qui encapsulent l'ARNm pour former des complexes capables de le protéger et le délivrer aux sites d'intérêt sont développés. Les progrès établis en vectorisation de l'ARNm, via des systèmes de délivrance toujours plus performants, ont contribué à l'essor de ces thérapies. Malgré cela, des défis persistent comme les injections chroniques, la toxicité, le stockage des formulations et l'amélioration de l'échappement endosomal. Par conséquent, l'étude de ces aspects est cruciale pour améliorer ces thérapies. Les stratégies mises en place pour surmonter ces défis consistent depuis longtemps à des criblages à haut débit avec parfois une compréhension limitée des mécanismes étudiés.

Dans ce cadre, mes travaux de thèse visent à optimiser des vecteurs lipidiques en étudiant les mécanismes moléculaires associés à leur utilisation, et peuvent être divisé en deux parties :

- Une première partie focalisée sur le développement de LNP : en étudiant les effets de différents lipides helpers sur leur trafic intracellulaire ainsi que leur efficacité de transfection in cellulo et in vivo, nous avons démontré l'importance du choix des lipides helpers pour s'adapter à l'application d'intérêt. Dans notre cas, la délivrance d'ARNm dans les cellules dendritiques et l'administration par voie intramusculaire pour une possible application en vaccination.

- Une seconde partie, au cours de laquelle j'ai optimisé le processus de formulation d'un liposome cationique histidylé (le Lip100) en développant le LYX plus reproductible et plus polyvalent, que j'ai par la suite caractérisé en évaluant ses variations de structure en fonction du pH, son trafic intracellulaire et ses performances. Cette étude a démontré l'importance de l'optimisation du processus de formulation sur la stabilité des liposomes,

mais aussi que le LYX est un vecteur prometteur pour la délivrance locale d'ARNm dans le cadre de la médecine régénérative.

Ensemble, ces travaux nous ont permis d'approfondir nos connaissances des interactions moléculaires liées à l'utilisation et la délivrance d'ARNm à l'aide de vecteurs lipidiques, notamment en analysant les relations entre : internalisation des particules, trafic intracellulaire et efficacité de transfection pour développer des vecteurs optimisés.

Les limites et perspectives de nos travaux

Dans le cadre de mes travaux, plusieurs limites apparaissent, ouvrant la voie à des perspectives d'optimisation que je vais présenter dans la section suivante.

L'étude des LNP (Medjmedj et al. 2022)

Cette étude compare trois formulations de LNP qui diffèrent par leurs lipides helpers (DSPC/Cholestérol, DOPE/Cholestérol et DOPE/ β -sitostérol). En effet, ces lipides modulent la stabilité et l'efficacité de transfection des nanoparticules (X. Cheng et Lee 2016) en modulant leur morphologie et leur échappement endosomal (Patel et al. 2020).

L'objectif était d'identifier la formulation qui induira la meilleure expression. Pour ce faire nous avons comparé la délivrance d'ARNm codant des protéines rapportrices (EGFP et Firefly luciférase) in cellulo (HEK293 et DC2.4) et in vivo (souris Balb/c).

Nos résultats ont démontré que les LNP à base de DOPE induisaient de meilleurs performances que celle à base de DSPC (voir chapitre 4, figure 2B), ce qui est en accord avec les données observées dans la littérature (R. Zhang et al. 2021; Álvarez-Benedicto et al. 2022). Enfin, le LNP-DOPE/ β S a été identifié comme optimal parmi les trois formulations testées in vivo, en adéquation avec les études suivantes (Eygeris et al. 2020; Patel et al. 2020).

En ce qui concerne les limites et les perspectives :

- D'une part, notre étude aurait pu être complétée par une quatrième formulation, un LNP à base de DSPC/ β -sitostérol (DSPC/ β S), la combinaison manquante des formulations testées dans l'article (DSPC/Chol, DOPE/Chol et DOPE/ β S). En effet, dans le cadre de l'étude in cellulo, en corrélant l'efficacité de transfection au trafic intracellulaire, nous avons observé que l'accumulation en Rab11 (marqueur des endosomes de recyclage) est inversement proportionnelle à l'efficacité de transfection (voir chapitre 4, figure 2B et 3D). Nos résultats suggèrent que les faibles performances du LNP-DSPC/Chol par rapport aux LNP-DOPE seraient liées à son accumulation en Rab11 à la différence des autres.

Dans ce contexte, je pense qu'un LNP-DSPC/ β S utilisé en contrôle aurait été enrichissant. De plus, il aurait été intéressant de comparer les performances induites par les LNP-DSPC/Chol, LNP-DSPC/ β S et les LNP-DOPE/ β S pour mieux évaluer le rôle du β -sitostérol dans la modulation des performances des LNP par voie intramusculaire *in vivo*. A mon sens, l'absence de ce contrôle est une des limites principales de l'étude.

- D'autre part, pour poursuivre notre étude des LNP, il serait intéressant d'analyser par SAXS et par cryoTEM les structures des différentes formulations. En effet, tout comme pour le LYX, cela pourrait nous apporter des données supplémentaires nous permettant de mieux identifier le rôle de chaque lipide helper. De plus, il serait aussi pertinent d'évaluer le stockage des formulations à différentes températures (ex : -80°C, -20°C, 4°C, température ambiante, 37°C), lyophilisé ou en solution pour mesurer les effets des lipides helpers sur le stockage. En effet, le stockage des formulations représente un enjeu important (Lu et al. 2024) dont nous discuterons par la suite. Il est donc important de l'évaluer en parallèle de l'efficacité de transfection, notamment dans le cadre de nos travaux où le DSPC, qui induit une moins bonne efficacité de transfection que le DOPE, est néanmoins reconnu pour améliorer la stabilité des vecteurs lipidiques (Álvarez-Benedicto et al. 2022). Une étude de stockage à long terme pourrait donc être pertinente (Kafle et al. 2024; Reinhart et al. 2023). Enfin, dans la continuité de ces travaux, des lipides helpers et ionisables sont synthétisés au laboratoire dans l'équipe du professeur Josef HAMACEK (CBM - Orléans).

L'étude du liposome cationique (Ngalle Loth et al. 2025)

Dans notre seconde étude, nous avons caractérisé le potentiel thérapeutique du LYX, une forme optimisée du Lip100, un liposome cationique histidylé développé pour la délivrance d'acide nucléique que nous avons décrit précédemment.

Nos résultats ont démontré l'efficacité du LYX pour délivrer des ARNm codant des protéines rapportrices : EGFP (voir chapitre 6, figure 4) et Firefly luciférase (voir chapitre 6, figure 7) ainsi que des protéines thérapeutiques : BMP-2 et BMP-9 (voir chapitre 6, figure 5) *in cellulo* et *in vivo*. De plus, une étude de l'échappement endosomal a été réalisée via l'analyse du trafic intracellulaire des lipoplexes par microscopie confocale (voir chapitre 6, figure 6), et l'étude de leur morphologie en fonction du pH par SAXS et cryoTEM (voir chapitre 6, figure 3). Cela nous a permis de proposer une hypothèse quant au mécanisme d'induction de l'échappement endosomal des lipoplexes à base de LYX (voir chapitre 6, section 4.2). Enfin, pour apporter une solution au stockage de longue durée des liposomes,

nous les avons lyophilisé, ce qui a permis de décupler la durée de stockage de quelques semaines à au moins 15 mois (voir supplementary chapitre 6, figure S2), permettant la production et le stockage de grands volumes de liposomes (Ngalle Loth et al. 2025).

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que le LYX est un vecteur prometteur pour la délivrance locale d'ARNm en médecine régénérative.

Toutefois, une des limites du LYX est sa cytotoxicité. Dans notre article, les doses ont été limitées à 10,0 pg d'ARNm par cellule car au-delà, la toxicité du liposome prime sur son efficacité. En mesurant la viabilité cellulaire en fonction de doses croissantes d'ARNm, nous avons constaté jusqu'à 50% de toxicité sur les HEK293 et les MSC humaines primaires (20 pg /cellule). Cette toxicité reste dépendante du type cellulaire et la cause n'a pas été clairement étudiée et identifiée au cours de ma thèse. Néanmoins, il est intéressant de noter que la toxicité du LYX semble proportionnelle à l'efficacité de transfection. En effet, à de fortes doses (20 pg/cellule), le LYX est plus toxique dans les types cellulaires dans lesquels il présente les meilleures efficacités de transfection (~50% de toxicité sur HEK293 et hMSC) par rapport aux types cellulaires dans lesquels il est moins performant (~7% de toxicité seulement sur C2C12).

Par conséquent, la toxicité serait pourrait-être liée à l'endommagement des endosomes causé par les liposomes au cours de l'échappement endosomal (J. Wang et al. 2024).

Une autre explication pourrait être liée au trafic intracellulaire. En effet, nous avons démontré que le LYX est moins efficace que la LFM pour s'échapper des endosomes. Il a été décrit que l'accumulation de vecteurs lipidiques dans de larges endosomes peut inhiber leur acidification (Chatterjee et al. 2024) et donc l'échappement endosomal, tout en induisant de la cytotoxicité (Paramasivam et al. 2021). Dans le but d'identifier la cause de la toxicité du LYX, les hypothèses précédentes seront testées.

Des défis persistants, mais surmontables

L'échappement endosomal

L'efficacité des formulations reste majoritairement conditionnée par l'efficacité du système de délivrance. Les LNP et lipoplexes pénètrent efficacement les membranes cellulaires : plus de 90% des cellules ont internalisé les complexes en 24h (Medjmedj et al. 2022; Ngalle Loth et al. 2025). Mais l'ARNm n'est pas traduit tant qu'il n'est pas libéré dans

le cytosol. Par conséquent, l'échappement endosomal représente un enjeu crucial des thérapies à base d'ARN.

Actuellement, il n'existe pas de technique spécifique qui permet de mesurer précisément les taux d'échappement endosomal ou la localisation subcellulaire précise. De plus, les connaissances accumulées sur le trafic des LNP pourraient différer en fonction du cargo (siRNA ou ARNm), (Chatterjee et al. 2024). L'étude de l'échappement endosomal est donc complexe et réalisée de manière indirecte en mesurant l'internalisation des vecteurs, leur trafic intracellulaire et leurs colocalisations avec des indicateurs spécifiques (Johansson et al. 2024).

Dans le but d'améliorer l'échappement endosomal des vecteurs lipidiques, de nombreuses équipes se focalisent sur la modification et la synthèse de lipides ionisables (Lu et al. 2024). Une équipe a tout récemment développé des lipides ionisables optimisés pour favoriser la rupture des endosomes, nommé « BEND » (branched endosomal disruptor) (Padilla et al. 2025). Ils démontrent que les LNP à base de BEND sont plus performants et moins toxiques, sans pour autant altérer leur physico-chimie. En somme, ces lipides pourraient être à l'origine d'une nouvelle génération de LNP plus performants, en surmontant l'obstacle que représente l'échappement endosomal.

Le stockage des formulations

Le stockage a un impact considérable sur les formulations. Un stockage réalisé dans de mauvaises conditions peut altérer l'efficacité d'un produit thérapeutique, le rendant inefficace, ou même dangereux (Lu et al. 2024).

Dans le cas des vaccins à ARNm développé pour lutter contre le SARS-CoV-2 (Comirnaty® et Spikevax®), les LNP devaient initialement être stockés à -80°C. Cela a compliqué leur distribution, notamment dans des régions où les équipements qui permettent d'atteindre ces températures sont difficilement accessibles. Néanmoins, les laboratoires semblent avoir conscience de cela car le Spikevax® de Moderna peut désormais se conserver à -50°C, et le mRESVIA®, plus récent et qui possède une formulation similaire, se conserve à -40°C. Ces modifications de conditions de conservation facilitent leur accessibilité.

Toutefois ces contraintes de conservation exigeantes sont liées à l'instabilité des formulations. L'instabilité des LNP est liée à des réactions en chaîne initiées par l'hydrolyse et l'oxydation des lipides (F. Cheng et al. 2023). Les impuretés produites peuvent interagir de manière covalente avec l'ARNm (formation d'adduits, soit l'association covalente de molécules), ce qui a pour conséquence d'inhiber fortement l'efficacité de transfection des LNP (Packer et al.

2021). Il est important de mentionner que la présence de ces adduits est particulièrement difficile à détecter, nécessitant des techniques d'analyses avancées comme l'HILIC (hydrophilic interaction chromatography) (Hashiba et al. 2024) ou la RP-IP HPLC (reversed-phase ion pair high performance liquid chromatography) (Packer et al. 2021), techniques encore peu utilisées dans les laboratoires.

Dans ce cadre, une étude s'est portée sur la formulation de LNP constitués de lipides modifiés (pipéridine) pour limiter la formation d'adduits. Ils ont démontré que les lipides ionisables pipéridine améliorent le stockage de longue durée. En effet, ils peuvent être stockés ~5 mois à 4°C, en solution (Hashiba et al. 2024).

D'autres pistes sont envisagées. L'instabilité des LNP serait aussi liée à l'hydrolyse de l'ARNm, qui mène au clivage des liaisons phosphodiester (Lu et al. 2024). Par conséquent, l'eau pourrait constituer une entrave au stockage. Afin d'améliorer le stockage des formulations, la lyophilisation de LNP a été testée. Une étude a notamment démontré 18 mois de stockage à 5°C sous forme lyophilisé (F. Cheng et al. 2023).

Enfin, d'autres stratégies innovantes, comme l'utilisation de microneedle patch (patch à micro-aiguilles) sont proposées. En effet, pour améliorer le stockage des LNP, ces patchs qui contiennent les nanoparticules peuvent être stockés à température ambiante pendant 6 mois (vander Straeten et al. 2024).

En somme, bien qu'il semble secondaire en recherche pré-clinique, le stockage des formulations est un enjeu majeur des thérapies à base d'ARNm, notamment lorsque l'on s'intéresse à la recherche clinique et la production à grande échelle.

CONCLUSION GENERALE

Les thérapies à base d'ARNm sont des technologies d'avenir qui s'appliquent à de nombreux domaines thérapeutiques comme la vaccination ou la médecine régénérative. Toutefois, des défis liés au stockage, à l'efficacité de transfection et à la cytotoxicité persistent dans leur utilisation. Par conséquent, il est important de continuer à approfondir nos connaissances des interactions moléculaires liées à l'utilisation et l'administration de l'ARNm, pour améliorer ces thérapies.

Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont permis, dans une première étude, d'optimiser une formulation de nanoparticules lipidiques (LNP) pour la délivrance d'ARNm dans le cadre d'une application vaccinale. Nous avons démontré que les LNP à base de DOPE induisent des pourcentages de transfection 4 fois plus élevés que ceux à base de DSPC sur cellules dendritiques (DC 2.4), cellules clés des stratégies vaccinales. En effet, selon nos analyses de microscopie confocale, cela s'explique par des différences de trafic intracellulaire, notamment une accumulation des LNP-DSPC dans les endosomes de recyclage. Enfin, nous avons mis en évidence l'effet combiné du DOPE et du β -sitostérol, qui améliore l'efficacité de transfection des LNP in vivo. Cette première étude démontre l'intérêt du choix des lipides auxiliaires pour la transfection des cellules dendritiques et l'administration d'ARNm par voie intramusculaire pour la vaccination.

D'autre part, dans une seconde étude, mes travaux de thèse ont permis d'optimiser un liposome cationique pour la délivrance d'ARNm pour la médecine régénérative. Nous avons optimisé le protocole de préparation d'un liposome cationique (Lip100) en ajoutant une étape de lyophilisation permettant de stocker de manière stable les liposomes pendant 15 mois à -20°C sans perte d'efficacité de transfection, puis une étape d'extrusion pour obtenir une solution monodisperse de liposomes de 150 nm (désignée LYX). Les performances biologiques des lipoplexes (LYX/ARNm) ont été évaluées et leurs structures analysées par SAXS et cryoTEM. Le LYX transfecte efficacement diverses lignées cellulaires et cellules primaires, pour la délivrance d'ARNm codant des protéines rapportrices et des facteurs ostéoinducteurs (BMPs), dans le cadre d'une application en régénération osseuse. Toutefois,

avec une efficacité inférieure à celle d'un vecteur commercial (Lipofectamine MessengerMAX™). Une analyse des mécanismes de transfection des deux vecteurs a révélé que le LYX est internalisé plus lentement et échappe moins efficacement aux endosomes que la Lipofectamine. Néanmoins, nous avons démontré une meilleure efficacité du LYX incorporé dans un hydrogel pour délivrer de l'ARNm in vitro et in vivo par rapport au vecteur commercial. Cette seconde étude démontre que le LYX est un vecteur prometteur pour la délivrance locale d'ARNm.

Au-delà de l'optimisation de l'efficacité de transfection, ou de la stabilité des systèmes de délivrance d'ARNm lipidiques étudiés (LNP et liposomes cationiques), mes travaux ont permis de mieux comprendre les liens entre : leur internalisation, leur trafic intracellulaire et leur efficacité de transfection, contribuant ainsi à l'amélioration des thérapies à base d'ARNm.

REFERENCES

- Akhter, Sohail, Mathieu Berchel, Paul-Alain Jaffrès, Patrick Midoux, et Chantal Pichon. 2022. « mRNA Lipoplexes with Cationic and Ionizable α -Amino-Lipophosphonates: Membrane Fusion, Transfection, mRNA Translation and Conformation ». *Pharmaceutics* 14 (3): 581. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030581>.
- Akinc, Akin, Martin A. Maier, Muthiah Manoharan, Kevin Fitzgerald, Muthusamy Jayaraman, Scott Barros, Steven Ansell, et al. 2019. « The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs ». *Nature Nanotechnology* 14 (12): 1084-87. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- Allain, Vanessa, Claudie Bourgaux, et Patrick Couvreur. 2012. « Self-Assembled Nucleolipids: From Supramolecular Structure to Soft Nucleic Acid and Drug Delivery Devices ». *Nucleic Acids Research* 40 (5): 1891-1903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr681>.
- Altyar, Ahmed E., Amr El-Sayed, Ahmed Abdeen, Marina Piscopo, Shaker A. Mousa, Agnieszka Najda, et Mohamed M. Abdel-Daim. 2023. « Future regenerative medicine developments and their therapeutic applications ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 158 (février):114131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114131>.
- Álvarez-Benedicto, Ester, Lukas Farbiak, Martha Márquez Ramírez, Xu Wang, Lindsay T. Johnson, Osamah Mian, Erick D. Guerrero, et Daniel J. Siegwart. 2022. « Optimization of Phospholipid Chemistry for Improved Lipid Nanoparticle (LNP) Delivery of Messenger RNA (mRNA) ». *Biomaterials Science* 10 (2): 549-59. <https://doi.org/10.1039/D1BM01454D>.
- Anassi, Enock, et Uche Anadu Ndefo. 2011. « Sipuleucel-T (Provenge) Injection ». *Pharmacy and Therapeutics* 36 (4): 197-202.
- Andretto, Valentina, Mathieu Repellin, Marine Pujol, Eyad Almouazen, Jacqueline Sidi-Boumedine, Thierry Granjon, Heyang Zhang, et al. 2023. « Hybrid core-shell particles for mRNA systemic delivery ». *Journal of Controlled Release* 353 (janvier):1037-49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.042>.
- Armengol, X., et J. Estelrich. 1995. « Physical Stability of Different Liposome Compositions Obtained by Extrusion Method ». *Journal of Microencapsulation* 12 (5): 525-35. <https://doi.org/10.3109/02652049509006783>.
- Arrabal, Pilar M., Rick Visser, Leonor Santos-Ruiz, José Becerra, et Manuel Cifuentes. 2013. « Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system ». *Biological Research* 46 (4): 421-29. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400013>.
- Baden, Lindsey R., Hana M. El Sahly, Brandon Essink, Karen Kotloff, Sharon Frey, Rick Novak, David Diemert, et al. 2021. « Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine ». *New England Journal of Medicine* 384 (5): 403-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>.
- Badieyan, Zohreh Sadat, Taras Berezhanskyy, Maximilian Utzinger, Manish Kumar Aneja, Daniela Emrich, Reinhold Erben, Christiane Schöler, et al. 2016. « Transcript-Activated Collagen Matrix as Sustained mRNA Delivery System for Bone Regeneration ». *Journal of Controlled Release* 239 (octobre):137-48. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.037>.

- Balmayor, Elizabeth R., Johannes P. Geiger, Manish K. Aneja, Taras Berezhanskyy, Maximilian Utzinger, Olga Mykhaylyk, Carsten Rudolph, et Christian Plank. 2016. « Chemically modified RNA induces osteogenesis of stem cells and human tissue explants as well as accelerates bone healing in rats ». *Biomaterials* 87 (mai):131-46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.018>.
- Balmayor, Elizabeth R., Johannes P. Geiger, Christian Koch, Manish K. Aneja, Martijn van Griensven, Carsten Rudolph, et Christian Plank. 2017. « Modified mRNA for BMP-2 in Combination with Biomaterials Serves as a Transcript-Activated Matrix for Effectively Inducing Osteogenic Pathways in Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 26 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0171>.
- Barbieri, Beatriz D., David J. Peeler, Karnyart Samnuan, Suzanne Day, Kai Hu, Hadijatou J. Sallah, John S. Tregoning, Paul F. McKay, et Robin J. Shattock. 2024. « The role of helper lipids in optimising nanoparticle formulations of self-amplifying RNA ». *Journal of Controlled Release* 374 (octobre):280-92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.08.016>.
- Berger, Simone, Ulrich Lächelt, et Ernst Wagner. 2024. « Dynamic carriers for therapeutic RNA delivery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121 (11): e2307799120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307799120>.
- Biochimie. 2025. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/biochimie-cours-avec-exemples-concrets-qcm-exercices-corriges-0>.
- Boerckel, Joel D., Yash M. Kolambkar, Kenneth M. Dupont, Brent A. Uhrig, Edward A. Phelps, Hazel Y. Stevens, Andrés J. García, et Robert E. Guldberg. 2011. « Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration ». *Biomaterials* 32 (22): 5241-51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.063>.
- Boyne, Philip J., Leslie C. Lilly, Robert E. Marx, Peter K. Moy, Myron Nevins, Daniel B. Spagnoli, et R. Gilbert Triplett. 2005. « De Novo Bone Induction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in Maxillary Sinus Floor Augmentation ». *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 63 (12): 1693-1707. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2005.08.018>.
- Brenner, S., F. Jacob, et M. Meselson. 1961. « An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis ». *Nature* 190 (4776): 576-81. <https://doi.org/10.1038/190576a0>.
- Brown, Douglas W., Ping Wee, Prakash Bhandari, Amirali Bukhari, Liliya Grin, Hector Vega, Maryam Hejazi, et al. 2024. « Safe and Effective in Vivo Delivery of DNA and RNA Using Proteolipid Vehicles ». *Cell* 187 (19): 5357-5375.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.07.023>.
- Bugnicourt, Loïc, et Catherine Ladavière. 2017. « A close collaboration of chitosan with lipid colloidal carriers for drug delivery applications ». *Journal of Controlled Release* 256 (juin):121-40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.018>.
- Burkus, J. Kenneth, Matthew F. Gornet, Curtis A. Dickman, et Thomas A. Zdeblick. 2002. « Anterior Lumbar Interbody Fusion Using rhBMP-2 with Tapered Interbody Cages ». *Journal of Spinal Disorders & Techniques* 15 (5): 337-49. <https://doi.org/10.1097/00024720-200210000-00001>.
- Cannarozzi, Gina, Nicol N. Schraudolph, Mahamadou Faty, Peter von Rohr, Markus T. Friberg, Alexander C. Roth, Pedro Gonnet, Gaston Gonnet, et Yves Barral. 2010. « A Role for Codon Order in Translation Dynamics ». *Cell* 141 (2): 355-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.036>.
- Cappannini, Andrea, Angana Ray, Elżbieta Purta, Sunandan Mukherjee, Pietro Boccaletto, S Naeim Moafinejad, Antony Lechner, et al. 2024. « MODOMICS: a database of RNA

- modifications and related information. 2023 update ». *Nucleic Acids Research* 52 (D1): D239-44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1083>.
- Carrasco, Manuel J., Suman Alisheety, Mohamad-Gabriel Alameh, Hooda Said, Lacey Wright, Mikell Paige, Ousamah Soliman, et al. 2021. « Ionization and Structural Properties of mRNA Lipid Nanoparticles Influence Expression in Intramuscular and Intravascular Administration ». *Communications Biology* 4 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02441-2>.
- Carreira, A.C., F.H. Lojudice, E. Halcsik, R.D. Navarro, M.C. Sogayar, et J.M. Granjeiro. 2014. « Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives ». *Journal of Dental Research* 93 (4): 335-45. <https://doi.org/10.1177/0022034513518561>.
- Chan, S. Hong, Christa N. Molé, Dillon Nye, Lili Mitchell, Nan Dai, Jackson Buss, Daniel W. Kneller, Joseph M. Whipple, et G. Brett Robb. 2023. « Biochemical Characterization of mRNA Capping Enzyme from Faustovirus ». *RNA* 29 (11): 1803-17. <https://doi.org/10.1261/rna.079738.123>.
- Chatterjee, Sushmita, Edo Kon, Preeti Sharma, et Dan Peer. 2024. « Endosomal Escape: A Bottleneck for LNP-Mediated Therapeutics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121 (11): e2307800120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2307800120>.
- Cheng, Feiran, Yiping Wang, Yu Bai, Zhenglun Liang, Qunying Mao, Dong Liu, Xing Wu, et Miao Xu. 2023. « Research Advances on the Stability of mRNA Vaccines ». *Viruses* 15 (3): 668. <https://doi.org/10.3390/v15030668>.
- Cheng, Xinwei, et Robert J. Lee. 2016. « The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Non-antigenic regulators of targeting for imaging and therapy, 99 (avril):129-37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>.
- Clogston, Jeffrey D. 2022. « Parameters, Methods and Considerations for the Physicochemical Characterization of Liposomal Products ». In *National Cancer Institute's Nanotechnology Characterization Laboratory Assay Cascade Protocols*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604275/>.
- Conry, R. M., A. F. LoBuglio, M. Wright, L. Sumerel, M. J. Pike, F. Johanning, R. Benjamin, D. Lu, et D. T. Curiel. 1995. « Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector ». *Cancer Research* 55 (7): 1397-1400.
- Crick, Francis. 1970. « Central Dogma of Molecular Biology ». *Nature* 227 (5258): 561-63. <https://doi.org/10.1038/227561a0>.
- Csobonyeiova, Maria, Stefan Polak, Radoslav Zamborsky, et Lubos Danisovic. 2017. « iPS cell technologies and their prospect for bone regeneration and disease modeling: A mini review ». *Journal of Advanced Research* 8 (4): 321-27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.02.004>.
- Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, et M. R. Mozafari. 2018. « Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems ». *Pharmaceutics* 10 (2): 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- Dastmalchi, Farhad, Aida Karachi, Yusuf Mehkri, Ashley O'Malley, Vignesh Subramaniam, Thomas Angelini, Duane Mitchell, et Maryam Rahman. 2021. « IMMUNO-20. HYDROGEL-CXCL9 VACCINE RESULTS IN MRNA DELIVERY TO DENDRITIC CELLS AND POTENT ANTI-TUMOR RESPONSES IN GBM ». *Neuro-Oncology* 23 (Supplement_6): vi96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab196.379>.

- De La Vega, Rodolfo E., Martijn van Griensven, Wen Zhang, Michael J. Coenen, Christopher V. Nagelli, Joseph A. Panos, Carlos J. Peniche Silva, et al. 2022. « Efficient healing of large osseous segmental defects using optimized chemically modified messenger RNA encoding BMP-2 ». *Science Advances* 8 (7): eabl6242. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl6242>.
- Delehedde, Christophe, Ivan Ciganek, Pierre Louis Bernard, Nabila Laroui, Cathy Costa Da Silva, Cristine Gonçalves, Jacques Nunes, et al. 2024. « Enhancing Natural Killer Cells Proliferation and Cytotoxicity Using Imidazole-Based Lipid Nanoparticles Encapsulating Interleukin-2 mRNA ». *Molecular Therapy Nucleic Acids* 35 (3). <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102263>.
- « Diffusion de rayons X | SAXS, Bio-SAXS, USAXS, WAXS ». s. d. Consulté le 17 novembre 2024. <https://www.malvernpanalytical.com/fr/products/technology/xray-analysis/xray-scattering>.
- Dimitriadis, Giorgos J. 1978. « Translation of Rabbit Globin mRNA Introduced by Liposomes into Mouse Lymphocytes ». *Nature* 274 (5674): 923-24. <https://doi.org/10.1038/274923a0>.
- D'Mello, Sheetal, Keerthi Atluri, Sean M. Geary, Liu Hong, Satheesh Elangovan, et Aliasger K. Salem. 2017. « Bone Regeneration Using Gene-Activated Matrices ». *The AAPS Journal* 19 (1): 43-53. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9982-2>.
- Dorozhkin, Sergey V., et Matthias Eppele. 2002. « Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 41 (17): 3130-46. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020902\)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1).
- Duan, Li-Juan, Qian Wang, Cuilian Zhang, Dong-Xiao Yang, et Xu-Yao Zhang. 2022. « Potentialities and Challenges of mRNA Vaccine in Cancer Immunotherapy ». *Frontiers in Immunology* 13 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.923647>.
- Dunst, Sebastian, Tom Kazimiers, Felix von Zadow, Helena Jambor, Andreas Sagner, Beate Brankatschk, Ali Mahmoud, et al. 2015. « Endogenously Tagged Rab Proteins: A Resource to Study Membrane Trafficking in Drosophila ». *Developmental Cell* 33 (3): 351-65. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.022>.
- Einhorn, Thomas A., et Louis C. Gerstenfeld. 2015. « Fracture Healing: Mechanisms and Interventions ». *Nature Reviews Rheumatology* 11 (1): 45-54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
- Elangovan, Satheesh, Behnoush Khorsand, Anh-Vu Do, Liu Hong, Alexander Dewerth, Michael Kormann, Ryan D. Ross, D. Rick Sumner, Chantal Allamargot, et Aliasger K. Salem. 2015. « Chemically modified RNA activated matrices enhance bone regeneration ». *Journal of Controlled Release* 218 (novembre):22-28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.050>.
- Evans, Christopher H. 2010. « Gene Therapy for Bone Healing ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12 (juin):e18. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001493>.
- Evans, Christopher H., et Johnny Huard. 2015. « Gene Therapy Approaches to Regenerating the Musculoskeletal System ». *Nature Reviews Rheumatology* 11 (4): 234-42. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.28>.
- Eygeris, Yulia, Siddharth Patel, Antony Jozic, et Gaurav Sahay. 2020. « Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery ». *Nano Letters* 20 (6): 4543-49. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386>.
- Felgner, P L, T R Gadek, M Holm, R Roman, H W Chan, M Wenz, J P Northrop, G M Ringold, et M Danielsen. 1987. « Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (21): 7413-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.

- Fu, Xiaorong, Ge Liu, Alexander Halim, Yang Ju, Qing Luo, et Guanbin Song. 2019. « Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair ». *Cells* 8 (8): 784. <https://doi.org/10.3390/cells8080784>.
- Furuichi, Y, M Morgan, A J Shatkin, W Jelinek, M Salditt-Georgieff, et J E Darnell. 1975. « Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (5): 1904-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1904>.
- Gary, Dana J., Jung Bin Min, Youngwook Kim, Keunchil Park, et You-Yeon Won. 2013. « The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-Based siRNA Complexes ». *Macromolecular bioscience* 13 (8): 1059-71. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300046>.
- Geall, Andrew J., Ayush Verma, Gillis R. Otten, Christine A. Shaw, Armin Hekele, Kaustuv Banerjee, Yen Cu, et al. 2012. « Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (36): 14604-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209367109>.
- Geng, Yingnan, Huichuan Duan, Liang Xu, Nevin Witman, Bingqian Yan, Zheyuan Yu, Huijing Wang, et al. 2021. « BMP-2 and VEGF-A modRNAs in Collagen Scaffold Synergistically Drive Bone Repair through Osteogenic and Angiogenic Pathways ». *Communications Biology* 4 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01606-9>.
- « Get the Right Lipid Nanoparticle Formulation for Stability ». 2024. 17 décembre 2024. <https://www.halolabs.com/blog/acheive-right-lipid-nanoparticle-formulation/>.
- Gilleron, Jerome, William Querbes, Anja Zeigerer, Anna Borodovsky, Giovanni Marsico, Undine Schubert, Kevin Manygoats, et al. 2013. « Image-Based Analysis of Lipid Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery, Intracellular Trafficking and Endosomal Escape ». *Nature Biotechnology* 31 (7): 638-46. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>.
- Gillman, Cassidy E., et Ambalangodage C. Jayasuriya. 2021. « FDA-Approved Bone Grafts and Bone Graft Substitute Devices in Bone Regeneration ». *Materials Science and Engineering: C* 130 (novembre):112466. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>.
- Gomi, Hiroshi, Kenichi Mori, Shigeyoshi Itohara, et Tetsuro Izumi. 2007. « Rab27b Is Expressed in a Wide Range of Exocytic Cells and Involved in the Delivery of Secretory Granules Near the Plasma Membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (11): 4377-86. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0409>.
- Gonçalves, Cristine, Mathieu Berchel, Marie-Pierre Gosselin, Virginie Malard, Hervé Cheradame, Paul-Alain Jaffrès, Philippe Guégan, Chantal Pichon, et Patrick Midoux. 2014. « Lipopolyplexes comprising imidazole/imidazolium lipophosphoramidate, histidinylated polyethyleneimine and siRNA as efficient formulation for siRNA transfection ». *International Journal of Pharmaceutics* 460 (1): 264-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.005>.
- Granger, Elizabeth, Gavin McNee, Victoria Allan, et Philip Woodman. 2014. « The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Endosome dynamics & Tubulogenesis, 31 (juillet):20-29. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.011>.
- Gustafsson, Jonas, Gösta Arvidson, Göran Karlsson, et Mats Almgren. 1995. « Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1235 (2): 305-12. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)80018-B](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)80018-B).
- Hale, Benjamin G., Richard E. Randall, Juan Ortín, et David Jackson. 2008. « The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses ». *Journal of General Virology* 89 (10): 2359-76. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>.
- Hamilton, Alex G., Kelsey L. Swingle, et Michael J. Mitchell. 2023. « Biotechnology: Overcoming Biological Barriers to Nucleic Acid Delivery Using Lipid

- Nanoparticles ». *PLOS Biology* 21 (4): e3002105. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002105>.
- Has, C., et P. Sunthar. 2020. « A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes ». *Journal of Liposome Research* 30 (4): 336-65. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>.
- Hashiba, Kazuki, Masamitsu Taguchi, Sachiko Sakamoto, Ayaka Otsu, Yoshiki Maeda, Hirofumi Ebe, Arimichi Okazaki, Hideyoshi Harashima, et Yusuke Sato. 2024. « Overcoming Thermostability Challenges in mRNA–Lipid Nanoparticle Systems with Piperidine-Based Ionizable Lipids ». *Communications Biology* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06235-0>.
- Heiser, Axel, Doris Coleman, Jens Dannull, Donna Yancey, Margaret A. Maurice, Costas D. Lallas, Philipp Dahm, Donna Niedzwiecki, Eli Gilboa, et Johannes Vieweg. 2002. « Autologous Dendritic Cells Transfected with Prostate-Specific Antigen RNA Stimulate CTL Responses against Metastatic Prostate Tumors ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (3): 409-17. <https://doi.org/10.1172/JCI14364>.
- Hemmi, Hiroaki, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Tsuneyasu Kaisho, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Makoto Matsumoto, et al. 2000. « A Toll-like Receptor Recognizes Bacterial DNA ». *Nature* 408 (6813): 740-45. <https://doi.org/10.1038/35047123>.
- Hou, Xucheng, Tal Zaks, Robert Langer, et Yizhou Dong. 2021. « Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery ». *Nature Reviews Materials* 6 (12): 1078-94. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>.
- Huotari, Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome maturation ». *The EMBO Journal* 30 (17): 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- Inagaki, Masahito. 2024. « Cell Reprogramming and Differentiation Utilizing Messenger RNA for Regenerative Medicine ». *Journal of Developmental Biology* 12 (1): 1. <https://doi.org/10.3390/jdb12010001>.
- Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, et Barry W. Ninham. 1977. « Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 470 (2): 185-201. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90099-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90099-2).
- Jacob, François, et Jacques Monod. 1961. « Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins ». *Journal of Molecular Biology* 3 (3): 318-56. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7).
- James, Aaron W., Gregory LaChaud, Jia Shen, Greg Asatryan, Vi Nguyen, Xinli Zhang, Kang Ting, et Chia Soo. 2016. « A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2 ». *Tissue Engineering Part B: Reviews* 22 (4): 284-97. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0357>.
- Javidanbardan, Amin, Ziqiao Wang, Abigail Kostic, Ali Behboudi, et Andrew L. Zydney. 2025. « Single-pass tangential flow filtration (SPTFF) for continuous mRNA concentration and purification ». *Journal of Membrane Science* 719 (mars):123730. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2025.123730>.
- Jayaraman, Muthusamy, Steven M. Ansell, Barbara L. Mui, Ying K. Tam, Jianxin Chen, Xinyao Du, David Butler, et al. 2012. « Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo ». *Angewandte Chemie International Edition* 51 (34): 8529-33. <https://doi.org/10.1002/anie.201203263>.
- Jia, Longfei, et Shu-Bing Qian. 2021a. « Therapeutic mRNA Engineering from Head to Tail ». *Accounts of Chemical Research* 54 (23): 4272-82. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00541>.
- . 2021b. « Therapeutic mRNA Engineering from Head to Tail ». *Accounts of Chemical Research* 54 (23): 4272-82. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00541>.

- Johansson, Johanna M., Hampus Du Rietz, Hampus Hedlund, Hanna C. Eriksson, Erik Oude Blenke, Aditya Pote, Said Harun, Pontus Nordenfelt, Lennart Lindfors, et Anders Wittrup. 2024. « Cellular and Biophysical Barriers to Lipid Nanoparticle Mediated Delivery of RNA to the Cytosol ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.05.31.596627>.
- Kafle, Urmila, Hoang Quan Truong, Cao Thuy Giang Nguyen, et Fanfei Meng. 2024. « Development of Thermally Stable mRNA-LNP Delivery Systems: Current Progress and Future Prospects ». *Molecular Pharmaceutics* 21 (12): 5944-59. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00826>.
- Karikó, Katalin, Michael Buckstein, Houping Ni, et Drew Weissman. 2005. « Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA ». *Immunity* 23 (2): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>.
- Karikó, Katalin, Hiromi Muramatsu, János Ludwig, et Drew Weissman. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>.
- Karra, Daniela, et Ralf Dahm. 2010. « Transfection Techniques for Neuronal Cells ». *Journal of Neuroscience* 30 (18): 6171-77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0183-10.2010>.
- Kauffman, Kevin J., Faryal F. Mir, Siddharth Jhunjhunwala, James C. Kaczmarek, Juan E. Hurtado, Jung H. Yang, Matthew J. Webber, et al. 2016. « Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles *in vivo* ». *Biomaterials* 109 (décembre):78-87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.006>.
- Khalid, Kanwal, et Chit Laa Poh. 2023. « The development of DNA vaccines against SARS-CoV-2 ». *Advances in Medical Sciences* 68 (2): 213-26. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2023.05.003>.
- Khalil, Andrew S., Xiaohua Yu, Jennifer M. Umhoefer, Connie S. Chamberlain, Linzie A. Wildenauer, Gaoussou M. Diarra, Timothy A. Hacker, et William L. Murphy. 2020. « Single-dose mRNA therapy via biomaterial-mediated sequestration of overexpressed proteins ». *Science Advances* 6 (27): eaba2422. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba2422>.
- Khorsand, Behnoush, Satheesh Elangovan, Liu Hong, Alexander Dewerth, Michael S. D. Kormann, et Aliasger K. Salem. 2017. « A Comparative Study of the Bone Regenerative Effect of Chemically Modified RNA Encoding BMP-2 or BMP-9 ». *The AAPS Journal* 19 (2): 438-46. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-0034-8>.
- Khorsand, Behnoush, Satheesh Elangovan, Liu Hong, Michael S. D. Kormann, et Aliasger K. Salem. 2019. « A Bioactive Collagen Membrane That Enhances Bone Regeneration ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 107 (6): 1824-32. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34275>.
- Kormann, Michael S. D., Günther Hasenpusch, Manish K. Aneja, Gabriela Nica, Andreas W. Flemmer, Susanne Herber-Jonat, Marceline Huppmann, et al. 2011. « Expression of Therapeutic Proteins after Delivery of Chemically Modified mRNA in Mice ». *Nature Biotechnology* 29 (2): 154-57. <https://doi.org/10.1038/nbt.1733>.
- Kowalski, Piotr S., Arnab Rudra, Lei Miao, et Daniel G. Anderson. 2019. « Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery ». *Molecular Therapy* 27 (4): 710-28. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.02.012>.

- Kwon, Suji, Minseon Kwon, Seongeun Im, Kyuri Lee, et Hyukjin Lee. 2022. « mRNA Vaccines: The Most Recent Clinical Applications of Synthetic mRNA ». *Archives of Pharmacol Research* 45 (4): 245-62. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01381-7>.
- Lane, C. D., G. Marbaix, et J. B. Gurdon. 1971. « Rabbit haemoglobin synthesis in frog cells: the translation of reticulocyte 9 s RNA in frog oocytes ». *Journal of Molecular Biology* 61 (1): 73-91. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90207-5).
- Lasic, Dan D. 1998. « Novel Applications of Liposomes ». *Trends in Biotechnology* 16 (7): 307-21. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7).
- Ledo, Adriana M., Ana Senra, Héctor Rilo-Alvarez, Erea Borrajo, Anxo Vidal, Maria J. Alonso, et Marcos Garcia-Fuentes. 2020. « mRNA-activated matrices encoding transcription factors as primers of cell differentiation in tissue engineering ». *Biomaterials* 247 (juillet):120016. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120016>.
- Lee, Hwankyung, Hyungwon Moon, et Hyun-Ryoung Kim. 2022. « Effects of Lipid Shape and Interactions on the Conformation, Dynamics, and Curvature of Ultrasound-Responsive Liposomes ». *Pharmaceutics* 14 (7): 1512. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071512>.
- Lemoine, Sandrine, et Marie Courbebaisse. 2022. « Petits ARN interférents : applications potentielles pour les néphrologues *Small interfering RNA: potential applications for nephrologists* ». *Néphrologie & Thérapeutique*, Nouvelles thérapies en néphrologie., 18 (6, Supplément 1): 6S1-6. [https://doi.org/10.1016/S1769-7255\(22\)00646-0](https://doi.org/10.1016/S1769-7255(22)00646-0).
- Leng, Qiuping, Zhuo Liang, et Yonggang Lv. 2021. « Demineralized bone matrix scaffold modified with mRNA derived from osteogenically pre-differentiated MSCs improves bone repair ». *Materials Science and Engineering: C* 119 (février):111601. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111601>.
- Leung, Ada W. Y., Carolyn Amador, Lin Chuan Wang, Urmi V. Mody, et Marcel B. Bally. 2019. « What Drives Innovation: The Canadian Touch on Liposomal Therapeutics ». *Pharmaceutics* 11 (3): 124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030124>.
- Leung, Alex K. K., Yuen Yi C. Tam, et Pieter R. Cullis. 2014. « Chapter Four - Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery ». In *Advances in Genetics*, édité par Leaf Huang, Dexi Liu, et Ernst Wagner, 88:71-110. Nonviral Vectors for Gene Therapy. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00004-3>.
- Leventis, Rania, et John R. Silvius. 1990. « Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1023 (1): 124-32. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90017-I](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90017-I).
- Lévy, Daniel, Aurélie Di Cicco, Aurélie Bertin, et Manuela Dezi. 2021. « La cryomicroscopie électronique révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants ». *Médecine/Sciences* 37 (4): 379-85. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021034>.
- Liu, Heng-Wen, Yizong Hu, Yong Ren, Hwanhee Nam, Jose Luis Santos, Shirley Ng, Like Gong, et al. 2021. « Scalable Purification of Plasmid DNA Nanoparticles by Tangential Flow Filtration for Systemic Delivery ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 13 (26): 30326-36. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c05750>.
- Liu, Yi, Zhen Hua Chia, Johannes Nathaniel Min Hui Liew, Shi Min Or, et Kyle K.L. Phua. 2018. « Modulation of mRNA Translation and Cell Viability by Influenza A Virus Derived Nonstructural Protein 1 ». *Nucleic Acid Therapeutics* 28 (3): 200-208. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0712>.
- Logeart-Avramoglou, D., M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, et H. Petite. 2006. « An Assay for the Determination of Biologically Active Bone Morphogenetic Proteins Using Cells Transfected with an Inhibitor of Differentiation Promoter-Luciferase

- Construct ». *Analytical Biochemistry* 349 (1): 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.030>.
- Lu, Ruei-Min, Hsiang-En Hsu, Ser John Lynon P. Perez, Monika Kumari, Guan-Hong Chen, Ming-Hsiang Hong, Yin-Shiou Lin, et al. 2024. « Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics ». *Journal of Biomedical Science* 31 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01080-z>.
- Lui, Kathy O., Lior Zangi, Eduardo A. Silva, Lei Bu, Makoto Sahara, Ronald A. Li, David J. Mooney, et Kenneth R. Chien. 2013. « Driving Vascular Endothelial Cell Fate of Human Multipotent Isl1+ Heart Progenitors with VEGF Modified mRNA ». *Cell Research* 23 (10): 1172-86. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.112>.
- Lv, Hongtao, Shubiao Zhang, Bing Wang, Shaohui Cui, et Jie Yan. 2006. « Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery ». *Journal of Controlled Release* 114 (1): 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>.
- Malone, R W, P L Felgner, et I M Verma. 1989. « Cationic liposome-mediated RNA transfection. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (16): 6077-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077>.
- Martinez-Arroyo, Olga, Estela Selma-Soriano, Ana Ortega, Raquel Cortes, et Josep Redon. 2021. « Small Rab GTPases in Intracellular Vesicle Trafficking: The Case of Rab3A/Raphillin-3A Complex in the Kidney ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (14): 7679. <https://doi.org/10.3390/ijms22147679>.
- Martinez-Campelo, Raquel, et Marcos Garcia-Fuentes. 2023. « Matrices Activated with Messenger RNA ». *Journal of Functional Biomaterials* 14 (1): 48. <https://doi.org/10.3390/jfb14010048>.
- Martinon, Frédéric, Sivadasan Krishnan, Gerlinde Lenzen, Rémy Magné, Elisabeth Gomard, Jean-Gérard Guillet, Jean-Paul Lévy, et Pierre Meulien. 1993. « Induction of Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Vivo by Liposome-Entrapped mRNA ». *European Journal of Immunology* 23 (7): 1719-22. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230749>.
- Massing, U., J. T. Kley, L. Gürtesch, et S. Fankhaenel. 2000. « A Simple Approach to DOTAP and Its Analogs Bearing Different Fatty Acids ». *Chemistry and Physics of Lipids* 105 (2): 189-91. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(00\)00121-3](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(00)00121-3).
- Maugeri, Marco, Muhammad Nawaz, Alexandros Papadimitriou, Annelie Angerfors, Alessandro Camponeschi, Manli Na, Mikko Hölttä, et al. 2019. « Linkage between Endosomal Escape of LNP-mRNA and Loading into EVs for Transport to Other Cells ». *Nature Communications* 10 (1): 4333. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>.
- Medjmedj, Ayoub, Albert Ngalle-Loth, Rudy Clemençon, Josef Hamacek, Chantal Pichon, et Federico Perche. 2022. « In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA ». *Nanomaterials* 12 (14): 2446. <https://doi.org/10.3390/nano12142446>.
- Medtronic. s. d. « Greffe osseuse – Interventions chirurgicales buccales et maxillo-faciales – Vidéos ». Consulté le 24 septembre 2024. <https://www.medtronic.com/ca-fr/professionnels-de-la-sante/traitements-interventions/interventions-buccales-maxillo-faciales-dentaires/greffe-osseuse/ressources-formation/videos.html>.
- Mével, Mathieu, Gilles Breuzard, Jean-Jacques Yaouanc, Jean-Claude Clément, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Paul-Alain Jaffrès, et Patrick Midoux. 2008. « Synthesis and Transfection Activity of New Cationic Phosphoramidate Lipids: High Efficiency of an Imidazolium Derivative ». *ChemBioChem* 9 (9): 1462-71. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700727>.

- Mével, Mathieu, Cécile Neveu, Cristine Gonçalves, Jean-Jacques Yaouanc, Chantal Pichon, Paul-Alain Jaffrès, et Patrick Midoux. 2008. « Novel Neutral Imidazole-Lipophosphoramides for Transfection Assays ». *Chemical Communications*, n° 27 (juillet), 3124-26. <https://doi.org/10.1039/B805226C>.
- Minnaert, An-Katrien, Helena Vanluchene, Rein Verbeke, Ine Lentacker, Stefaan C. De Smedt, Koen Raemdonck, Niek N. Sanders, et Katrien Remaut. 2021. « Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: Getting the message across ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 176 (septembre):113900. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113900>.
- Mislick, K. A., et J. D. Baldeschwieler. 1996. « Evidence for the Role of Proteoglycans in Cation-Mediated Gene Transfer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (22): 12349-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12349>.
- Miyazono, Kohei, Yuto Kamiya, et Masato Morikawa. 2010. « Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction ». *The Journal of Biochemistry* 147 (1): 35-51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>.
- Muramatsu, Hiromi, Kieu Lam, Csaba Bajusz, Dorottya Laczkó, Katalin Karikó, Petra Schreiner, Alan Martin, Peter Lutwyche, James Heyes, et Norbert Pardi. 2022. « Lyophilization Provides Long-Term Stability for a Lipid Nanoparticle-Formulated, Nucleoside-Modified mRNA Vaccine ». *Molecular Therapy* 30 (5): 1941-51. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.001>.
- Nele, Valeria, Virginia Campani, Seyedeh Alia Moosavian, et Giuseppe De Rosa. 2024. « Lipid Nanoparticles for RNA Delivery: Self-Assembling vs Driven-Assembling Strategies ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 208 (mai):115291. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115291>.
- Nele, Valeria, Margaret N. Holme, Ulrike Kauscher, Michael R. Thomas, James J. Douth, et Molly M. Stevens. 2019. « Effect of Formulation Method, Lipid Composition, and PEGylation on Vesicle Lamellarity: A Small-Angle Neutron Scattering Study ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 35 (18): 6064-74. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04256>.
- Ngalle Loth, Albert, Manon Maroquenne, Ayoub Medjmedj, Franck Coste, Thomas Bizien, Chantal Pichon, Delphine Logeart-Avramoglou, et Federico Perche. 2025. « Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery ». *Journal of Controlled Release* 379 (mars):164-76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.010>.
- Niidome, T., et L. Huang. 2002. « Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral Vectors ». *Gene Therapy* 9 (24): 1647-52. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301923>.
- « Nucléotide ». 2024. In *Wikipédia*. <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Nucl%C3%A9otide&oldid=216629569>.
- Oryan, Ahmad, Soodeh Alidadi, Ali Moshiri, et Nicola Maffulli. 2014. « Bone Regenerative Medicine: Classic Options, Novel Strategies, and Future Directions ». *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>.
- Ostro, Marc J., Dario Giacomoni, Don Lavelle, William Paxton, et Sheldon Dray. 1978. « Evidence for Translation of Rabbit Globin mRNA after Liposomemediated Insertion into a Human Cell Line ». *Nature* 274 (5674): 921-23. <https://doi.org/10.1038/274921a0>.
- Oude Egberink, Rik, Helen M. Zegelaar, Najoua El Boujnouni, Elly M. M. Versteeg, Willeke F. Daamen, et Roland Brock. 2022. « Biomaterial-Mediated Protein Expression Induced by Peptide-mRNA Nanoparticles Embedded in Lyophilized Collagen

- Scaffolds ». *Pharmaceutics* 14 (8): 1619. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081619>.
- Packer, Meredith, Dipendra Gyawali, Ravikiran Yerabolu, Joseph Schariter, et Phil White. 2021. « A Novel Mechanism for the Loss of mRNA Activity in Lipid Nanoparticle Delivery Systems ». *Nature Communications* 12 (1): 6777. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26926-0>.
- Padilla, Marshall S., Kaitlin Mrksich, Yiming Wang, Rebecca M. Haley, Jacqueline J. Li, Emily L. Han, Rakan El-Mayta, et al. 2025. « Branched Endosomal Disruptor (BEND) Lipids Mediate Delivery of mRNA and CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complex for Hepatic Gene Editing and T Cell Engineering ». *Nature Communications* 16 (1): 996. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55137-6>.
- Paramasivam, Prasath, Christian Franke, Martin Stöter, Andreas Höijer, Stefano Bartesaghi, Alan Sabirsh, Lennart Lindfors, et al. 2021. « Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale ». *Journal of Cell Biology* 221 (2): e202110137. <https://doi.org/10.1083/jcb.202110137>.
- Pardi, Norbert, Michael J. Hogan, Rebecca S. Pelc, Hiromi Muramatsu, Hanne Andersen, Christina R. DeMaso, Kimberly A. Dowd, et al. 2017. « Zika Virus Protection by a Single Low-Dose Nucleoside-Modified mRNA Vaccination ». *Nature* 543 (7644): 248-51. <https://doi.org/10.1038/nature21428>.
- Pardi, Norbert, Kaela Parkhouse, Ericka Kirkpatrick, Meagan McMahon, Seth J. Zost, Barbara L. Mui, Ying K. Tam, et al. 2018. « Nucleoside-Modified mRNA Immunization Elicits Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies ». *Nature Communications* 9 (1): 3361. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05482-0>.
- Passmore, Lori A., et Jeff Collier. 2022. « Roles of mRNA Poly(A) Tails in Regulation of Eukaryotic Gene Expression ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23 (2): 93-106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>.
- Patel, Siddharth, N. Ashwanikumar, Ema Robinson, Yan Xia, Cosmin Mihai, Joseph P. Griffith, Shanguo Hou, et al. 2020. « Naturally-Occurring Cholesterol Analogues in Lipid Nanoparticles Induce Polymorphic Shape and Enhance Intracellular Delivery of mRNA ». *Nature Communications* 11 (1): 983. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14527-2>.
- Perche, Federico, Gosset ,David, Mével ,Mathieu, Miramon ,Marie-Laure, Yaouanc ,Jean-Jacques, Pichon ,Chantal, Benvegna ,Thierry, Jaffrès ,Paul-Alain, et Patrick and Midoux. 2011. « Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes ». *Journal of Drug Targeting* 19 (5): 315-25. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.504262>.
- Petsch, Benjamin, Margit Schnee, Annette B. Vogel, Elke Lange, Bernd Hoffmann, Daniel Voss, Thomas Schlake, et al. 2012. « Protective Efficacy of in Vitro Synthesized, Specific mRNA Vaccines against Influenza A Virus Infection ». *Nature Biotechnology* 30 (12): 1210-16. <https://doi.org/10.1038/nbt.2436>.
- Polack, Fernando P., Stephen J. Thomas, Nicholas Kitchin, Judith Absalon, Alejandra Gurtman, Stephen Lockhart, John L. Perez, et al. 2020. « Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine ». *New England Journal of Medicine* 383 (27): 2603-15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
- Prockop, Darwin J. 1997. « Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues ». *Science* 276 (5309): 71-74. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71>.
- « PR-Solutions pour la prévention des fractures en France-3-9-2024.pdf ». s. d. Consulté le 2 janvier 2025. <https://www.osteoporosis.foundation/sites/iofbonehealth/files/2024-08/PR->

- Solutions%20pour%20la%20pr%C3%A9vention%20des%20fractures%20en%20France-3-9-2024.pdf.
- Qin, Shugang, Xiaoshan Tang, Yuting Chen, Kepan Chen, Na Fan, Wen Xiao, Qian Zheng, et al. 2022. « mRNA-Based Therapeutics: Powerful and Versatile Tools to Combat Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 1-35. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01007-w>.
- Rajendran, Arun Kumar, Sivashanmugam Amirthalingam, et Nathaniel S. Hwang. 2022. « A Brief Review of mRNA Therapeutics and Delivery for Bone Tissue Engineering ». *RSC Advances* 12 (15): 8889-8900. <https://doi.org/10.1039/D2RA00713D>.
- Reinhart, Anne-Gaëlle, Anja Osterwald, Philippe Ringler, Yael Leiser, Matthias E. Lauer, Rainer E. Martin, Christoph Ullmer, Felix Schumacher, Claudia Korn, et Michael Keller. 2023. « Investigations into mRNA Lipid Nanoparticles Shelf-Life Stability under Nonfrozen Conditions ». *Molecular Pharmaceutics* 20 (12): 6492-6503. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00956>.
- Ren, T., Y. K. Song, G. Zhang, et D. Liu. 2000. « Structural Basis of DOTMA for Its High Intravenous Transfection Activity in Mouse ». *Gene Therapy* 7 (9): 764-68. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301153>.
- Sahin, Ugur, Katalin Karikó, et Özlem Türeci. 2014. « mRNA-Based Therapeutics — Developing a New Class of Drugs ». *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (10): 759-80. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
- Salim, Malinda, Hiroyuki Minamikawa, Akihiko Sugimura, et Rauzah Hashim. 2014. « Amphiphilic Designer Nano-Carriers for Controlled Release: From Drug Delivery to Diagnostics ». *MedChemComm* 5 (11): 1602-18. <https://doi.org/10.1039/C4MD00085D>.
- Schmidt, Andrew H. 2021. « Autologous bone graft: Is it still the gold standard? » *Injury* 52 (juin):S18-22. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.01.043>.
- Schoenmaker, Linde, Dominik Witzigmann, Jayesh A. Kulkarni, Rein Verbeke, Gideon Kersten, Wim Jiskoot, et Daan J. A. Crommelin. 2021. « mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability ». *International Journal of Pharmaceutics* 601 (mai):120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- Scott, Cameron C., Fabrizio Vacca, et Jean Gruenberg. 2014. « Endosome maturation, transport and functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Endosome dynamics & Tubulogenesis, 31 (juillet):2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
- Semple, Sean C., Akin Akinc, Jianxin Chen, Ammen P. Sandhu, Barbara L. Mui, Connie K. Cho, Dinah W. Y. Sah, et al. 2010. « Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery ». *Nature Biotechnology* 28 (2): 172-76. <https://doi.org/10.1038/nbt.1602>.
- Semple, Sean C., Sandra K. Klimuk, Troy O. Harasym, Nancy Dos Santos, Steven M. Ansell, Kim F. Wong, Norbert Maurer, et al. 2001. « Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1510 (1): 152-66. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00343-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00343-6).
- Serim, Tuğrul Mert, Gülin Amasya, Tuğba Eren-Böncü, Ceyda Tuba Şengel-Türk, et Ayşe Nurten Özdemir. 2024. « Electrospun Nanofibers: Building Blocks for the Repair of Bone Tissue ». *Beilstein Journal of Nanotechnology* 15 (1): 941-53. <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.77>.
- Shah, Sanket, Vivek Dhawan, René Holm, Mangal S. Nagarsenker, et Yvonne Perrie. 2020. « Liposomes: Advancements and Innovation in the Manufacturing Process ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 154-155:102-22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.

- Sheen, Jonathon R., Ahmed Mabrouk, et Vishnu V. Garla. 2024. « Fracture Healing Overview ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>.
- Shin, Dongwon, Krist T Azizian, Jordana M Henderson, Richard I Hogrefe, Alexandre Lebedev, Michael Houston, et Anton P McCaffrey. s. d. « CleanCap® Co-Transcriptional Capping Streamlines mRNA Manufacturing ».
- Sivandzade, Farzane, et Luca Cucullo. 2021. « Regenerative Stem Cell Therapy for Neurodegenerative Diseases: An Overview ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 2153. <https://doi.org/10.3390/ijms22042153>.
- Smietanski, Mirosław, Maria Werner, Elzbieta Purta, Katarzyna H. Kaminska, Janusz Stepinski, Edward Darzynkiewicz, Marcin Nowotny, et Janusz M. Bujnicki. 2014. « Structural Analysis of Human 2'-O-Ribose Methyltransferases Involved in mRNA Cap Structure Formation ». *Nature Communications* 5 (1): 3004. <https://doi.org/10.1038/ncomms4004>.
- Stewart, Phoebe L. 2017. « Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography of Nanoparticles ». *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9 (2): e1417. <https://doi.org/10.1002/wnan.1417>.
- Straeten, Aurélien vander, Morteza Sarmadi, John L. Daristotle, Maria Kanelli, Lisa H. Tostanoski, Joe Collins, Apurva Pardeshi, et al. 2024. « A Microneedle Vaccine Printer for Thermostable COVID-19 mRNA Vaccines ». *Nature Biotechnology* 42 (3): 510-17. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01774-z>.
- « Structure secondaire d'un acide nucléique ». 2023. In *Wikipédia*. https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Structure_secondaire_d%27un_acide_nucl%C3%A9ique&oldid=200520773.
- Studier, F. William, et Barbara A. Moffatt. 1986. « Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes ». *Journal of Molecular Biology* 189 (1): 113-30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- Suleiman, Ahmed AbdulJabbar, Rawaa Al-Chalabi, et Semaa A. Shaban. 2024. « Integrative Role of Small Non-Coding RNAs in Viral Immune Response: A Systematic Review ». *Molecular Biology Reports* 51 (1): 107. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09141-6>.
- Sun, Da, et Zheng-Rong Lu. 2023. « Structure and Function of Cationic and Ionizable Lipids for Nucleic Acid Delivery ». *Pharmaceutical Research* 40 (1): 27-46. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03460-2>.
- S Zaitseva, Tatiana, Guang Yang, Dimitris Dionyssiou, Maedeh Zamani, Steve Sawamura, Eduard Yakubov, James Ferguson, et al. 2020. « Delivery of Hepatocyte Growth Factor Mrna from Nanofibrillar Scaffolds in a Pig Model of Peripheral Arterial Disease ». *Regenerative Medicine* 15 (6): 1761-73. <https://doi.org/10.2217/rme-2020-0023>.
- Tajer, Benjamin, James A. Dutko, Shawn C. Little, et Mary C. Mullins. 2021. « BMP heterodimers signal via distinct type I receptor class functions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (15): e2017952118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017952118>.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- « The Long History of mRNA Vaccines | Johns Hopkins | Bloomberg School of Public Health ». 2021. 6 octobre 2021. <https://publichealth.jhu.edu/2021/the-long-history-of-mrna-vaccines>.
- Trepotec, Zeljka, Johannes Geiger, Christian Plank, Manish K. Aneja, et Carsten Rudolph. 2019. « Segmented Poly(A) Tails Significantly Reduce Recombination of Plasmid

- DNA without Affecting mRNA Translation Efficiency or Half-Life ». *RNA* 25 (4): 507-18. <https://doi.org/10.1261/rna.069286.118>.
- Tros de Ilarduya, Conchita, Yan Sun, et Nejat Düzgüneş. 2010. « Gene delivery by lipoplexes and polyplexes ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40 (3): 159-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.03.019>.
- Tudek, Agnieszka, Marta Lloret-Llinares, et Torben Heick Jensen. 2018. « The multitasking polyA tail: nuclear RNA maturation, degradation and export ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373 (1762): 20180169. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0169>.
- Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, et Vito Pistoia. 2008. « Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 8 (9): 726-36. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- Wang, Jialiang, Yaopeng Ding, Kellie Chong, Meng Cui, Zeyu Cao, Chenjue Tang, Zhen Tian, Yuping Hu, Yu Zhao, et Shaoyi Jiang. 2024. « Recent Advances in Lipid Nanoparticles and Their Safety Concerns for mRNA Delivery ». *Vaccines* 12 (10): 1148. <https://doi.org/10.3390/vaccines12101148>.
- Wang, Pinpin, Delphine Logeart-Avramoglou, Hervé Petite, Cristine Goncalves, Patrick Midoux, Federico Perche, et Chantal Pichon. 2020. « Co-Delivery of NS1 and BMP2 mRNAs to Murine Pluripotent Stem Cells Leads to Enhanced BMP-2 Expression and Osteogenic Differentiation ». *Acta Biomaterialia* 108 (mai):337-46. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.045>.
- Wang, Pinpin, Federico Perche, Patrick Midoux, Cátia S.D. Cabral, Virginie Malard, Ilídio J. Correia, Hanane El-Hafci, Hervé Petite, Delphine Logeart-Avramoglou, et Chantal Pichon. 2021. « In Vivo Bone Tissue Induction by Freeze-Dried Collagen-Nanohydroxyapatite Matrix Loaded with BMP2/NS1 mRNAs Lipopolyplexes ». *Journal of Controlled Release* 334 (juin):188-200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.04.021>.
- Wang, Yu-Shiuan, Monika Kumari, Guan-Hong Chen, Ming-Hsiang Hong, Joyce Pei-Yi Yuan, Jui-Ling Tsai, et Han-Chung Wu. 2023. « mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications ». *Journal of Biomedical Science* 30 (1): 84. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00977-5>.
- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356): 737-38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- Wei, Lingxi, Wenqi Yan, Wahid Shah, Zhengwei Zhang, Minghe Wang, Biao Liu, Zhentong Xue, et al. 2024. « Advancements and Challenges in Stem Cell Transplantation for Regenerative Medicine ». *Heliyon* 10 (16). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35836>.
- Weisman, Sarah, Danielle Hirsch-Lerner, Yechezkel Barenholz, et Yeshayahu Talmon. 2004. « Nanostructure of Cationic Lipid-Oligonucleotide Complexes ». *Biophysical Journal* 87 (1): 609-14. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.033480>.
- White, Andrew P., Alexander R. Vaccaro, Jeremy A. Hall, Peter G. Whang, Brian C. Friel, et Michael D. McKee. 2007. « Clinical Applications of BMP-7/OP-1 in Fractures, Nonunions and Spinal Fusion ». *International Orthopaedics* 31 (6): 735-41. <https://doi.org/10.1007/s00264-007-0422-x>.
- Wilusz, Jeremy E., Courtney K. JnBaptiste, Laura Y. Lu, Claus-D. Kuhn, Leemor Joshua-Tor, et Phillip A. Sharp. 2012. « A Triple Helix Stabilizes the 3' Ends of Long Noncoding RNAs That Lack Poly(A) Tails ». *Genes & Development* 26 (21): 2392-2407. <https://doi.org/10.1101/gad.204438.112>.

- Wolff, Jon A., Robert W. Malone, Phillip Williams, Wang Chong, Gyula Acsadi, Agnes Jani, et Philip L. Felgner. 1990. « Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo ». *Science* 247 (4949): 1465-68. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>.
- Xu, Y., et F. C. Szoka. 1996. « Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection ». *Biochemistry* 35 (18): 5616-23. <https://doi.org/10.1021/bi9602019>.
- Xue, Yonger, Yuebao Zhang, Yichen Zhong, Shi Du, Xucheng Hou, Wenqing Li, Haoyuan Li, et al. 2024. « LNP-RNA-Engineered Adipose Stem Cells for Accelerated Diabetic Wound Healing ». *Nature Communications* 15 (1): 739. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45094-5>.
- Yu, Xinyang, Hongjian Li, Chunbo Dong, Shaolong Qi, Kai Yang, Bing Bai, Kun Peng, et al. 2023. « Poly(Ethyl Ethylene Phosphate): Overcoming the “Polyethylene Glycol Dilemma” for Cancer Immunotherapy and mRNA Vaccination ». *ACS Nano* 17 (23): 23814-28. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c07932>.
- Zerial, Marino, et Heidi McBride. 2001. « Rab Proteins as Membrane Organizers ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (2): 107-17. <https://doi.org/10.1038/35052055>.
- Zhang, Jingjing, Yuheng Liu, Chao Li, Qin Xiao, Dandan Zhang, Yang Chen, Joseph Rosenecker, Xiaoyan Ding, et Shan Guan. 2023a. « Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules ». *Pharmaceutics* 15 (9): 2182. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092182>.
- . 2023b. « Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules ». *Pharmaceutics* 15 (9): 2182. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092182>.
- . 2023c. « Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules ». *Pharmaceutics* 15 (9): 2182. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092182>.
- Zhang, Rui, Rakan El-Mayta, Timothy J. Murdoch, Claude C. Warzecha, Margaret M. Billingsley, Sarah J. Shepherd, Ningqiang Gong, et al. 2021. « Helper Lipid Structure Influences Protein Adsorption and Delivery of Lipid Nanoparticles to Spleen and Liver ». *Biomaterials Science* 9 (4): 1449-63. <https://doi.org/10.1039/D0BM01609H>.
- Zhang, Wanting, Yuxin Jiang, Yonglong He, Hamza Boucetta, Jun Wu, Zhongjian Chen, et Wei He. 2023. « Lipid carriers for mRNA delivery ». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 13 (10): 4105-26. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.11.026>.
- Zhang, Wen, Rodolfo E. De La Vega, Michael J. Coenen, Sebastian A. Müller, Carlos J. Peniche Silva, Manish K. Aneja, Christian Plank, Martijn van Griensven, Christopher H. Evans, et Elizabeth R. Balmayor. 2019. « An Improved, Chemically Modified RNA Encoding BMP-2 Enhances Osteogenesis In Vitro and In Vivo ». *Tissue Engineering Part A* 25 (1-2): 131-44. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0112>.
- Zhang, Yuebao, Changzhen Sun, Chang Wang, Katarina E. Jankovic, et Yizhou Dong. 2021. « Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery ». *Chemical Reviews* 121 (20): 12181-277. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00244>.
- Zheng, Lining, Sarith R. Bandara, Zhengzhong Tan, et Cecilia Leal. 2023. « Lipid nanoparticle topology regulates endosomal escape and delivery of RNA to the cytoplasm ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (27): e2301067120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2301067120>.
- Zhou, Zhuxian, Xiangrui Liu, Dingcheng Zhu, Yue Wang, Zhen Zhang, Xuefei Zhou, Nasha Qiu, Xuesi Chen, et Youqing Shen. 2017. « Nonviral cancer gene therapy: Delivery cascade and vector nanoproperty integration ». *Advanced Drug Delivery Reviews*,

Nanoformulations for combination or cascade anticancer therapy, 115 (juin):115-54.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.021>.

Zimmermann, Tracy S., Amy C. H. Lee, Akin Akinc, Birgit Bramlage, David Bumcrot, Matthew N. Fedoruk, Jens Harborth, et al. 2006. « RNAi-Mediated Gene Silencing in Non-Human Primates ». *Nature* 441 (7089): 111-14.
<https://doi.org/10.1038/nature04688>.

Annexes - Congrès et brevets

2022

- Poster scientifique : **SF Nano Annual Meeting** : du 5 au 7 Décembre 2022, à Strasbourg

« In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA »

Ayoub Medjmedj^{1,†}, **Albert Ngalle-Loth**^{1,†}, Rudy Clemençon¹, Josef Hamacek^{1,2}, Chantal Pichon¹
and Federico Perche¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France; ayoub.medjmedj@cnrs-orleans.fr (A.M.); albert.ngalle-loth@cnrs-orleans.fr (A.N.-L.); rudy.clemencon@cnrs.fr (R.C.); josef.hamacek@cnrs.fr (J.H.); pichon@cnrs.fr (C.P.)

† These authors contributed equally to this work.

2023

- Poster scientifique : **35^{ème} colloque Biotechnocentre** : du 19 au 20 Octobre 2023, à Nouan le Fuzelier

« Development of therapeutic mRNA matrices and evaluation of their osteogenic potential for repairing bone tissue » - **prix du meilleur poster**

Albert NGALLE LOTH¹, Ayoub Medjmedj¹, Manon MAROQUENNE², Rudy CLEMENÇON¹, Cyril GUIMPIED¹, Joseph HAMACEK¹, Chantal PICHON¹, Delphine LOGEART-AVRAMOGLU² et Federico PERCHE¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR4301, Université d'Orléans, Orléans Cedex 2, 45071 France

² Laboratoire de Biologie Ostéo-Articulaire, Bioingénierie et Bioimagerie, UMR CNRS 7052 INSERM U1271, 75010 Paris, France

2024

- Présentation Orale : **NanoMed international conference and exhibition 2024** : du 23 au 25 Octobre 2024, à Barcelone

« Characterization of lyophilized, extruded histidylated liposome, a versatile platform for mRNA delivery »

- Poster scientifique : **Innovation day – Matchmaking** : le 28 Novembre 2024, à Paris

« Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery using SAXS, CryoTEM and confocal microscopy »

Albert Ngalle Loth¹, Manon Maroquenne², Ayoub Medjmedj¹, Franck Coste¹, Thomas Bizien⁵, Chantal Pichon^{3,4}, Delphine Logeart-Avramoglou^{2*}, Federico Perche^{1*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS UPR4301, Orléans, France - ² Université Paris Cité, CNRS, INSERM, ENVA, B3OA, 75010, Paris, France - ³ Inserm UMS 55 ART ARNm and LI2RSO, Université d'Orléans, F-45100 Orléans - ⁴ Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, F-75035 Paris, France - ⁵ Université Paris-Saclay, Synchrotron Soleil, 91190, Saint-Aubin, France

- Brevet (n°WO2024231621A1), « **Acide nucléique synthétique et ses utilisations thérapeutiques** »

Albert Ngalle Loth¹, Ayoub Medjmedj¹, Federico Perche^{1*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CBM, CNRS UPR4301, Orléans, France

Développement et caractérisation de système de délivrance lipidique d'ARNm thérapeutique pour la médecine régénérative

Résumé de la thèse

Le développement de systèmes de délivrance, comme les nanoparticules lipidiques (LNP) pour les vaccins contre le COVID-19, a été un facteur clés dans l'évolution des thérapies à base d'ARNm qui depuis connaissent un succès international. Cependant, plusieurs aspects cruciaux tels que, le stockage, l'efficacité de transfection, l'échappement endosomal, ou la biocompatibilité des formulations, représentent encore des défis majeurs à relever pour améliorer ces thérapies. Dans ce cadre, les objectifs de cette thèse ont été d'optimiser et de caractériser des LNP et liposomes pour la délivrance d'ARNm.

Dans une première étude trois formulations de LNP (DSPC/cholesterol*, DOPE/cholesterol* et DOPE/ β -sitosterol*) ont été comparées. L'objectif était d'identifier la meilleure formulation pour la délivrance d'un ARNm thérapeutique conçu pour la vaccination. Nos résultats montrent que celles formulées avec le DOPE induisent une meilleure expression des gènes rapporteurs in cellulo et in vivo. Cette première étude démontre l'intérêt du choix des lipides auxiliaires pour la transfection des cellules dendritiques et l'administration d'ARNm par voie intramusculaire pour la vaccination.

Dans une seconde étude, nous avons optimisé le protocole de préparation d'un liposome cationique (désigné Lip100) conçu pour délivrer de l'ARN et déjà développé au laboratoire. Nous avons ajouté une étape de lyophilisation permettant de stocker de manière stable les liposomes 15 mois à -20°C sans perte d'efficacité de transfection, puis une étape d'extrusion pour obtenir une solution monodisperse de liposome de 150 nm (désignée LYX). Les performances biologiques des lipoplexes (LYX/ARNm) ont été évaluées et leurs structures analysées par SAXS et cryoTEM. Le LYX transfecte efficacement diverses lignées cellulaires et cellules primaires, pour la délivrance d'ARNm codant des protéines rapportrices et des facteurs ostéogénétiques (BMPs), dans le cadre d'une application en régénération osseuse. Toutefois, avec une efficacité inférieure à celle d'un vecteur commercial (Lipofectamine MessengerMAX™). Une analyse des mécanismes de transfection des deux vecteurs démontre une internalisation plus lente et un échappement endosomal moins efficace du LYX par rapport à la Lipofectamine. Néanmoins, nous avons démontré une meilleure efficacité du LYX incorporé dans un hydrogel pour délivrer de l'ARNm in vitro et in vivo. Cette étude démontre que le LYX est un vecteur prometteur pour la délivrance d'ARNm.

En conclusion, nos travaux nous ont permis d'optimiser deux systèmes de délivrance (LNP et liposomes) et d'approfondir nos connaissances des mécanismes de transfection, contribuant ainsi à l'amélioration des thérapies à base d'ARNm.

* DSPC : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE : 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
Chol : Cholestérol
 β S : β -sitostérol

Mots clés : Liposome – LNP – Thérapie à base d'ARNm – Trafic intracellulaire – Médecine régénérative

Development and characterization of lipid-based delivery system for therapeutic mRNA in regenerative medicine

Thesis summary

The development of suitable delivery systems, such as lipid nanoparticles (LNPs) for COVID-19 vaccines, has been a key factor in the evolution of mRNA-based therapies, which have since enjoyed international success. However, several crucial aspects, such as storage, transfection efficiency, endosomal escape and biocompatibility of formulations, still represent major challenges to be overcome to improve these therapies. In this context, the objectives of this thesis were to optimise and characterise LNPs and liposomes for mRNA delivery.

In a first study, three LNP formulations (DSPC/cholesterol*, DOPE/cholesterol* and DOPE/ β -sitosterol*) were compared. The aim was to identify the best formulation to deliver a therapeutic mRNA designed for vaccination. Our results show that those formulated with DOPE induce better expression of reporter genes in cellulo and in vivo. This initial study demonstrates the value of auxiliary lipids selection for transfecting dendritic cells and administering mRNA by intramuscular route for vaccination.

In a second study, we optimised the formulation protocol of a cationic liposome (designated Lip100) designed for RNA delivery and already developed in the laboratory. We added a freeze-drying step to enable the liposomes to be stably stored for 15 months at -20°C with no loss of transfection efficiency, followed by an extrusion step to obtain a monodisperse 150 nm liposome solution (designated LYX). The biological performances of lipoplexes (LYX/mRNA) were assessed and their structures analysed by SAXS and cryoTEM. LYX efficiently transfects various cell lines and primary cells to deliver mRNA encoding reporter proteins and osteoinductive factors (BMPs) for bone regeneration application. However, with a lower efficiency in comparison with the commercial vector (Lipofectamine MessengerMAX™). Transfection mechanisms analysis of the two vectors showed slower internalisation and less efficient endosomal escape of LYX compared with Lipofectamine. Nevertheless, we demonstrated greater efficacy of LYX incorporated into a hydrogel to deliver mRNA in vitro and in vivo. This study demonstrates that LYX is a promising vector for mRNA delivery.

In conclusion, our work allowed us to optimise two delivery systems (LNP and liposomes) and to extend our knowledge of transfection mechanisms, thereby contributing to the improvement of mRNA-based therapies.

* DSPC : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE : 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
Chol : Cholesterol
 β S : β -sitosterol

Key words : Liposome – LNP – mRNA-based therapy – Intracellular trafficking – Regenerative medicine



Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR4301)
Rue Charles Sadron, 45071 Orléans



