

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant -
SSBCV*

Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR 4301)

THÈSE présentée par :

Ayoub MEDJMEDJ

Soutenue le : 01 décembre 2025

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

Discipline/ Spécialité : Biologie - Biologie Moléculaire et Cellulaire, Thérapie génique

Évaluation de l'ARN messager synthétique délivré par des nanoparticules lipidiques : impact des lipides helper et des éléments UTR/poly(A) sur l'efficacité d'expression

THÈSE dirigée par :
PERCHE Federico

CR CNRS, Centre de Biophysique moléculaire, Orléans

RAPPORTEURS :
DUCA Maria
SCHMITT Emmanuelle

DR CNRS, Institut de Chimie de Nice
DR CNRS, Ecole Polytechnique, Paris

JURY :

BOUDVILLAIN Marc
DUCA Maria
SCHMITT Emmanuelle
CHAPAT Clément
HAMACEK Josef
PERCHE Federico

DR CNRS, CBM, Orléans, Président de jury
DR CNRS, Institut de Chimie de Nice
DR CNRS, Ecole Polytechnique, Paris
CR CNRS, CBI, Toulouse, Examinateur
PU, Université d'Orléans, Examinateur
CR CNRS, CBM, Orléans, Directeur de thèse

Sommaire

Tables des figures	i
Liste des abréviations.....	ii
Préambule	1
Chapitre 1 : Thérapie à base d'ARNm de la découverte à la clinique	2
1. L'ARN messenger.....	2
1.1. La coiffe	3
1.2. La 5' UTR	4
1.3. La séquence codante.....	5
1.4. La 3' UTR	5
1.5. La queue poly(A)	6
2. Traduction et régulation de l'ARNm.....	7
3. L'ARNm comme plateforme thérapeutique	11
4. Les applications cliniques de l'ARNm	13
4.1. La vaccination à base d'ARNm.....	14
4.2. Thérapie de protéin-replacement	17
4.3. Anticorps thérapeutiques dérivés d'ARNm.....	18
4.4. Thérapies cellulaires et géniques basées sur l'ARNm	19
5. Production de l'ARNm par transcription <i>in vitro</i>	20
6. Immunogénicité innée de l'ARNm synthétique	22
7. Optimisation de l'ARNm synthétique	24
7.1. La coiffe en extrémité 5'	25
7.2. Les régions non traduites 5' et 3' UTR	27
7.3. La séquence codante.....	29
7.4. La queue poly(A)	30

Chapitre 2 : Vectorisation et délivrance d'ARNm par les nanoparticules lipidiques	32
1. La découverte et le développement des nanoparticules lipidiques	32
2. Composition des LNPs	37
2.1. Lipides ionisables	37
2.2. Les phospholipides helpers	40
2.3. Le stérol	40
2.4. Les lipides PEGylés	41
3. Formulation des LNPs	42
4. Caractérisations et contrôles qualités des LNPs	44
5. Optimisation des LNPs	46
Résultats : premier article	49
Impact des lipides auxiliaires sur l'efficacité et le trafic intracellulaire des LNPs..	50
Résultats : deuxième article	51
Évaluation de l'ARNm synthétique avec des séquences UTR sélectionnées et une queue poly(A) alternative	68
6. Les constructions plasmidiques	69
Discussion générale	97
Conclusion et perspectives	105
Références	107
Annexes – Congrès, publications et brevets	119

Tables des figures

Figure 1 : Structure primaire de l'ARN messenger mature incluant les différents domaines du 5' au 3'.....	3
Figure 2 : Structure de la coiffe de l'ARNm (Cap 0, Cap 1, et Cap 2)	4
Figure 3 : L'initiation de la traduction canonique (cap-dependent translation)	9
Figure 4 : Dégradation de l'ARNm dans le cytoplasme	10
Figure 5 : Développement chronologique des thérapies à base d'ARNm.	13
Figure 6 : Représentation schématique des classes de médicaments actuellement en essais cliniques utilisant la technologie ARNm.....	14
Figure 7 : Principe de vaccination à base d'ARNm.....	16
Figure 8 : La transcription in vitro.....	22
Figure 9 : Schéma de l'activation immunitaire induite par l'ARN	23
Figure 10 : Chronologie des avancées majeures en formulation ayant permis le développement des vaccins et thérapies à ARN	33
Figure 11 : Autoassemblage des lipides amphiphiles	34
Figure 12 : Evolution de la structure des lipides ionisables.....	36
Figure 13 : Structures chimiques des lipides cationiques/ionisables classés en fonction de leurs trois composants fonctionnels	39
Figure 14 : Schéma de l'assemblage des complexes ARN-LNP	43
Figure 15 : Composants typiques et préparation des LNPs.....	47
Figure 16 : Schéma de la conception des différents éléments de l'ARNm pour la stratégie de clonage par site de restriction	69
Figure 17 : Gel d'agarose du clonage des plasmides avec la 5'UTR NeoUTR3 et les différentes 3'UTRs.....	70
Figure 18 : Différentes stratégies pour diriger les LNPs vers des tissus/types cellulaires spécifiques.....	100

Liste des abréviations

ARCA : Anti reverse cap analog

CAD : Charged Aerosol Detector

CBP : Cap-binding complex

CDS : Coding DNA sequence

CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

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

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

Dlin-MC3-DMA : dilinoleylmethyl-4-
dimethylaminobutyrate

DLS : Dynamic light scattering

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

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

EGFP : Enhanced Green Fluorescent
Protein

ELS : Electrophoretic light scattering

ELSD : Evaporative Light Scattering
Detector

IVT : *in vitro* transcription

LNP : Lipid nanoparticle

PEG : Polyéthylène glycol

PIC : Pre-initiation complex

RBP : RNA binding proteins

RP-IP HPLC : Reversed-phase ion pair high
performance liquid chromatography

SAXS : Small-angle x-ray scattering

SORT : Selective organ targeting

TISU : Translation initiator of short 5'UTR

TLR : Toll like receptor

uORF : upstream open reading frame

UTR : Untranslated region

Préambule

Le succès extraordinaire des vaccins à ARNm contre le SARS-CoV-2 (Covid-19) en 2020, à savoir Comirnaty® de Pfizer-BioNTech et Spikevax® de Moderna, a démontré le potentiel de l'ARNm comme plateforme thérapeutique innovante.

Au-delà des maladies infectieuses, cette plateforme thérapeutique suscite un vif intérêt pour le traitement de pathologies telles que les cancers. En effet, l'ARNm est délivré aux cellules à l'aide de nanoparticules lipidiques et l'efficacité de la technologie ARNm dépend à la fois de la séquence de l'ARNm, qui influence sa stabilité et sa traduction, et du système de délivrance, qui conditionne sa protection, sa biodistribution et son ciblage cellulaire.

Dans le cadre de la compréhension et de l'amélioration de la technologie ARNm-LNP, ma thèse visait dans un premier temps à évaluer l'impact des lipides dits « helpers » sur la formulation LNP, puis dans un second temps à optimiser les régions non traduites et la queue poly(A) de l'ARNm synthétique. Le premier chapitre de ce manuscrit abordera les thérapies à base d'ARNm, de la découverte à la clinique, tandis que le second sera consacré à la vectorisation et à la délivrance de l'ARNm par les nanoparticules lipidiques.

Chapitre 1 : Thérapie à base d'ARNm de la découverte à la clinique

Dans ce chapitre, nous aborderons la thérapie à base d'ARN messenger (ARNm) depuis sa découverte jusqu'à son utilisation en clinique, en tant que plateforme thérapeutique. Nous commencerons par aborder la découverte de l'ARNm, ses composants, ainsi que les mécanismes de sa traduction et de sa régulation. Nous examinerons ensuite l'application de l'ARNm en tant qu'outil vaccinal et plateforme thérapeutique pour diverses pathologies, en détaillant les méthodes de synthèse *in vitro* et les différentes stratégies permettant d'optimiser ses propriétés et ses performances.

1. L'ARN messenger

Chez les eucaryotes, l'expression génique débute par la transcription de l'ADN en ARNm dans le noyau, et ensuite la traduction de l'ARNm en protéine dans le cytoplasme.

L'ARNm a été découvert pour la première fois en 1961 par des chercheurs pionniers (Brenner et al., 1961). Il s'agit d'un type d'acide ribonucléique à simple brin synthétisé par transcription à partir d'un brin d'ADN dans le noyau cellulaire. La transcription de l'ARNm est la première étape du processus de l'expression génique eucaryote, qui consiste en l'assemblage de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) une enzyme multiprotéique et des facteurs de transcription généraux sur l'ADN promoteur. Ce processus hautement régulé implique environ 80 protéines différentes qui, ensemble, forment le complexe de pré-initiation (PIC) (Farnung & Vos, 2022). Le pré-messager résultant subit ensuite, au cours de l'étape de maturation nucléaire, des modifications co- et post-transcriptionnelles, comprenant l'ajout d'une coiffe 5' méthylguanosine, l'épissage, ainsi que l'addition d'une queue poly(A) en extrémité 3'. L'ARNm mature ainsi généré est exporté vers le cytoplasme où il est reconnu et traduit par les ribosomes, ce qui conduit à la synthèse des protéines, la traduction des ARNm sera détaillée plus tard dans ce chapitre.

L'ARNm mature possède une structure primaire, généralement constituée de cinq éléments (de 5' à 3') (figure 1) : une coiffe, une région non traduite en 5' (5' untranslated region « UTR »), une séquence codante, une région non traduite en 3' (3' UTR) et une queue poly(A).

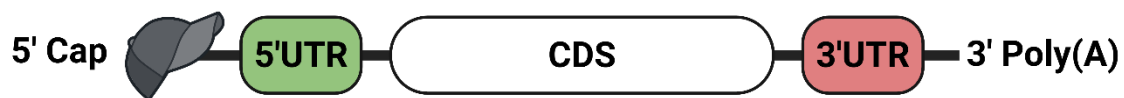


Figure 1 : Structure primaire de l'ARN messager mature incluant les différents domaines du 5' au 3' (Schéma créé sur Biorender).

1.1. La coiffe

Tous les ARNm eucaryotes possèdent une coiffe en leur extrémité 5'. Le capping est la première modification apportée à l'ARN transcrit par l'ARN polymérase II et se déroule de manière co-transcriptionnelle dans le noyau, dès que les 25 à 30 premiers nucléotides sont incorporés dans le transcrit naissant (Ramanathan et al., 2016).

Cette coiffe 5' est constituée d'une 7-méthylguanosine inversée ajoutée au premier nucléotide de l'ARNm durant la transcription, via une liaison triphosphate 5'-5' (ppp). En plus de la coiffe 5' (m7GpppN, cap0), le premier nucléotide ou les deux premiers nucléotides de l'ARNm peuvent être méthylés en position 2'-O donnant ainsi une coiffe de type 1 (m7GpppNm, cap1), ou de type 2 (m7GpppNmNm, cap2), respectivement (figure 2) (Langberg & Moss, 1981). Cette 2'-O-méthylation des nucléotides N1 et N2 confère une signature moléculaire permettant de distinguer l'ARN du soi de l'ARN exogène, tout en empêchant l'activation des capteurs endosomaux et cytosoliques tels que retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), un récepteur du système immunitaire inné (Daffis et al., 2010).

La coiffe 5' participe à de nombreuses interactions indispensables aux fonctions cellulaires. Elle est d'abord requise pour l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, par liaison au cap-binding complex (CBC) (Galloway & Cowling, 2019). Dans le cytosol, la structure de la coiffe protège l'ARNm contre le clivage par les exonucléases, et recrute le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (eIF4E), favorisant la reconnaissance par le ribosome et l'initiation de la traduction (Galloway & Cowling, 2019).

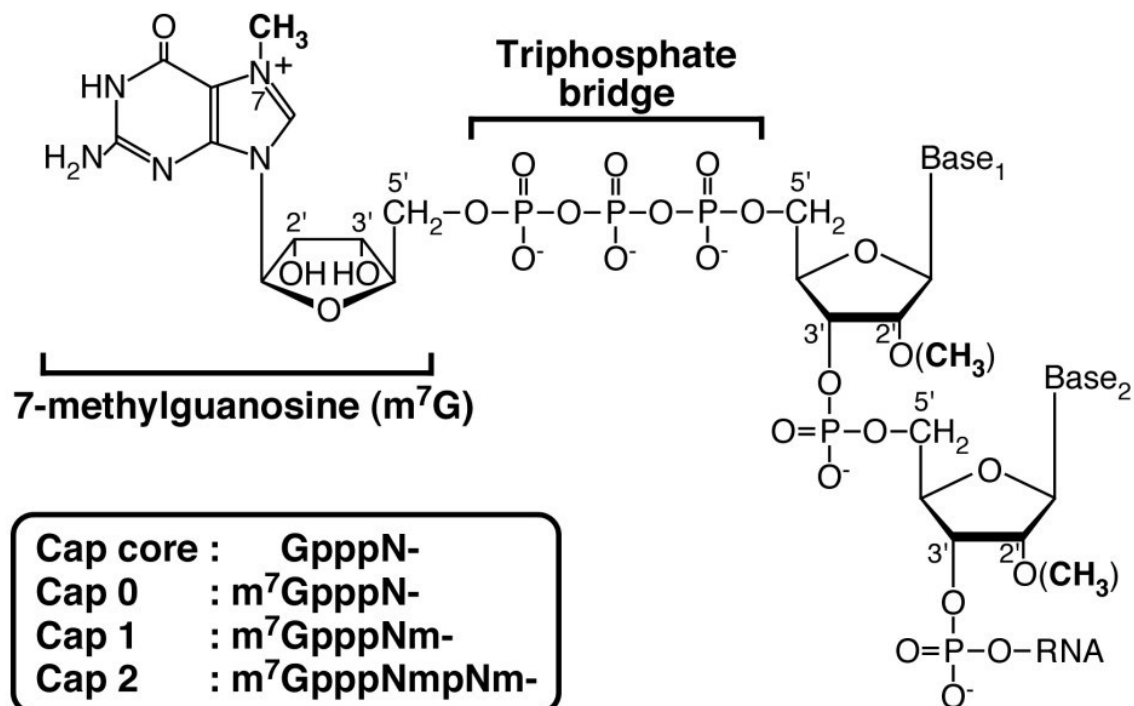


Figure 2 : Structure de la coiffe de l'ARNm (Cap 0, Cap 1, et Cap 2) (Ogino & Banerjee, 2011).

1.2. La 5' UTR

La région 5' non traduite (5' UTR) est une séquence non traduite de l'ARNm qui joue le rôle de point d'entrée du ribosome pour la traduction. La longueur, la composition en nucléotides ainsi que la structure secondaire de la 5' UTR varient significativement entre différents ARNm.

Certains ARNm n'ont pas de 5' UTR, comme c'est le cas de toutes les espèces d'ARNm dans les mitochondries de mammifères dits « leaderless », mais ils sont généralement rares chez les eucaryotes supérieurs (Akulich et al., 2016). Certains ARNm humains ont une 5' UTR extrêmement courte (12 nucléotides en moyenne), connue sous le nom de Translation Initiator of Short 5' UTR (TISU). Ces ARNm subissent une initiation de traduction sans le scanning du ribosome (Leppek et al., 2018). En revanche, certaines 5' UTR sont très structurées et peuvent bloquer l'entrée du ribosome. Les séquences riches en GC du 5' UTR forment souvent des structures secondaires stables, qui peuvent soit entraver, soit faciliter la liaison des ribosomes en fonction des conditions cellulaires, régulant ainsi de manière dynamique la synthèse des protéines.

La séquence Kozak représente un autre contrôle de type *cis-acting*¹ de la traduction, encadrant le codon start AUG et ayant un impact direct sur l'efficacité de la traduction. La séquence de Kozak est décrite comme le contexte nucléotidique optimal entourant le codon start AUG : GCCRCCaugG, dans laquelle la purine (R) en position -3 et le G en position +1 par rapport au codon de départ AUG sont les bases les plus importantes pour permettre une traduction efficace (Ambrosini et al., 2022). De plus, la 5' UTR peut contenir des séquences régulatrices appelées uORF « upstream open reading frame ». Les uORF sont de courts cadres de lecture situés en amont de la séquence codante principale.

1.3. La séquence codante

Par définition, un cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame ou ORF) est un ensemble contigu de codons délimité par un codon start (généralement AUG) et un codon stop (UAA, UAG ou UGA). Il représente la séquence qui peut potentiellement être traduite en une protéine fonctionnelle par le ribosome.

La séquence codante (Coding DNA Sequence ou CDS) est comparable à l'ORF, à la différence que la CDS est confirmée expérimentalement ou bien annotée dans les bases de données génomiques comme étant une séquence effectivement traduite en protéine fonctionnelle (Furuno et al., 2003).

1.4. La 3' UTR

La région 3' non traduite (3' UTR) est une séquence non codante de l'ARNm située en aval du codon stop de la traduction. Elle est connue pour influencer le destin des ARNm en régulant leur stabilité, la traduction et la localisation (Mayr, 2017). Les fonctions des 3' UTR sont médiées par des RNA binding proteins (RBP) qui se lient aux 3' UTR en fonction de leur séquence ou de leur structure. Cependant, les RBP agissent uniquement comme des adaptateurs qui relient les 3' UTR aux protéines effectrices. Ainsi, les conséquences biologiques médiées par les 3' UTR dépendent des fonctions des protéines effectrices (Mayr, 2019).

La 3' UTR contient des éléments régulateurs tels que des éléments de réponse aux micro-ARN (MRE), des éléments riches en AU (AU-rich element ou ARE), et des signaux

¹ Cis-acting : Il s'agit de séquences ou de caractéristiques structurelles spécifiques situées sur la molécule d'ARNm elle-même et qui influencent directement sa propre traduction.

de polyadénylation. Les ARE, caractérisés par des motifs AUUUA répétés, recrutent des protéines qui modulent la déstabilisation ou la stabilisation de l'ARNm, permettant ainsi une adaptation rapide aux signaux cellulaires. Les MRE servent de sites de liaison pour les microARN, qui bloquent la traduction ou favorisent la dégradation de l'ARNm en s'appariant avec des séquences cibles, permettant ainsi de réguler avec précision l'expression des gènes. En outre, les séquences du 3' UTR assurent la localisation de l'ARNm dans des compartiments subcellulaires spécifiques, garantissant ainsi une synthèse protéique limitée dans l'espace (Mayr, 2017).

1.5. La queue poly(A)

Les premières études sur l'ARN messenger eucaryote ont rapidement révélé que ce messenger du code génétique est polyadénylé à l'extrémité 3'. Presque tous les ARNm eucaryotes possèdent des queues poly(A), la seule exception connue étant certains transcrits d'histones de mammifères (Passmore & Collier, 2022). Les ARN pré-messenger sont clivés de manière co-transcriptionnelle au niveau d'un site poly(A), puis polyadénylés avant d'être exportés vers le cytoplasme. Chez les mammifères, après polyadénylation la longueur moyenne de la queue poly(A) varie de 150 à 250 nucléotides (nt). Cependant, la nature dynamique des queues poly(A) devient évidente dans le cytoplasme, où elles subissent des altérations dynamiques caractérisées par des processus de raccourcissement et d'élongation secondaire. La longueur à l'équilibre des queues poly(A) d'ARNm des mammifères se stabilise à environ 80 à 100 nt, reflétant un équilibre finement régulé entre les événements de dégradation et d'élongation (Biziaev et al., 2024). Il convient de noter qu'il existe un mécanisme important qui peut avoir lieu sur les produits ARNm en fonction du signal séquentiel spécifique de leur 3' UTR, appelé polyadénylation alternative (APA). La APA peut générer plusieurs isoformes d'ARNm à partir d'un seul gène (Ren et al., 2020).

La queue poly(A) affecte à la fois l'état de la traduction et la stabilité des ARNm, et elle fonctionne comme un régulateur principal de l'expression des gènes dans le cytoplasme. En particulier, elle peut agir en synergie avec la coiffe de 7-méthylguanosine (m7Gppp) à l'extrémité 5' de l'ARNm pour stimuler la traduction (Gallie, 1991). La queue poly(A) de l'ARNm se lie au poly(A) binding proteins (PABP), qui participent à leur tour à la traduction et sont nécessaires au maintien de la stabilité de l'ARNm via des interactions importantes notamment la liaison au facteur d'initiation eIF4G du complexe de liaison à

la coiffe eIF4F, ainsi qu'au facteur de terminaison de la traduction eRF3 (Nicholson & Pasquinelli, 2019).

2. Traduction et régulation de l'ARNm

Comme évoqué précédemment, l'ARNm assure le transfert de l'information génétique du noyau cellulaire aux ribosomes dans le cytoplasme, où il sert de matrice pour la synthèse des protéines. Une fois dans le cytoplasme, les ARNm sont soit traduits immédiatement, soit stockés pour une traduction ultérieure ou dégradés. Les ARNm initialement traduits peuvent ultérieurement être temporairement réprimés au niveau traductionnel (Shyu et al., 2008). Tous les ARNm finissent par être dégradés selon une cinétique bien déterminée.

Comment ces décisions sont-elles prises par la cellule ?

Les mécanismes de contrôle qualité de l'ARN couplés à la traduction détectent le blocage des ribosomes ou les arrêts prématurés de la traduction, et induisent la dégradation de l'ARNm ainsi que le recyclage des ribosomes, ce qui empêche la synthèse de protéines aberrantes et potentiellement toxiques pour la cellule. Il existe 3 voies de contrôle qualité de l'ARNm à savoir : (i) No-go mRNA decay (NGD) déclenché par la présence de structures secondaires de l'ARNm entraînant un arrêt du ribosome, (ii) non-stop mRNA decay (NSD) déclenché après le ralentissement de lecture du ribosome de la queue poly(A) à la suite de l'absence d'un codon stop, et (iii) nonsense-mediated mRNA decay (NMD) qui élimine les ARNm qui contiennent des codons stop prématurés (premature termination codons, PCT), empêchant ainsi la synthèse de protéines tronquées (Monaghan et al., 2023).

La traduction de l'ARNm chez les eucaryotes est un processus complexe et hautement régulé qui se déroule dans le cytoplasme et comprend trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la traduction canonique (cap-dependent translation) commence par le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S et de ses facteurs d'initiation eucaryotes associés (eukaryotic initiation factors, eIFs) à la structure de la coiffe 7-méthylguanosine (m7G) en 5' (Jackson et al., 2010). La première étape de l'initiation est l'assemblage du complexe trimérique de liaison à la coiffe eIF4F au niveau de la coiffe en extrémité 5'. Ce complexe trimérique est constitué de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, du facteur d'échafaudage eIF4G, et de l'hélicase à

ARN eIF4A. L'eIF4G au niveau de la coiffe interagit avec la PABP au niveau de la queue poly(A), ce qui permet la circularisation de l'ARNm. Cette conformation favorise le recrutement du complexe de pré-initiation 43S par eIF4G, via son interaction avec eIF3 (étape 1, figure 3). Ce complexe 43S est composé d'eIF3, de la sous-unité ribosomique 40S, du complexe ternaire constitué d'eIF2 lié au GTP et de l'ARNt initiateur (eIF2-GTP-Met-tRNAi), ainsi que d'eIF1, eIF1A et eIF5 (non représentés dans la figure) (Jackson et al., 2010; Lipppek et al., 2018). Une fois associé à l'extrémité 5' de l'ARNm, le complexe 43S progresse « scanne » le long de la région 5' non traduite (5' UTR) dans le sens 5'→3' (étape 2, figure 3) jusqu'à rencontrer le codon start (AUG). Ce scanning est facilité par l'activité hélicase d'eIF4A, qui déstabilise les structures secondaires inhibitrices présentes dans la 5' UTR, telles que les structures en tige-boucle. La liaison stable du complexe 43S au codon start conduit à la formation du complexe d'initiation 48S (étape 3, figure 3) et déclenche l'hydrolyse du GTP ainsi que la libération des eIFs. Ensuite, la grande sous-unité ribosomique 60S rejoint la sous-unité 40S pour former le ribosome 80S compétent pour l'élongation (étape 4, figure 3), qui procède alors à l'élongation de la traduction (étape 5, Figure 3). La terminaison de la traduction se produit lorsque le ribosome rencontre un codon stop (UAA, UAG ou UGA). Ces codons ne correspondent à aucun ARNt, mais sont reconnus par des facteurs de libération spécifiques (eukaryotic release factors ou eRFs). Ces facteurs catalysent l'hydrolyse de la liaison entre la chaîne polypeptidique et l'ARNt situé au site P, ce qui libère ainsi la protéine nouvellement synthétisée. Les sous-unités ribosomiques se dissocient ensuite, prêtes pour un nouveau cycle de traduction (Lipppek et al., 2018).

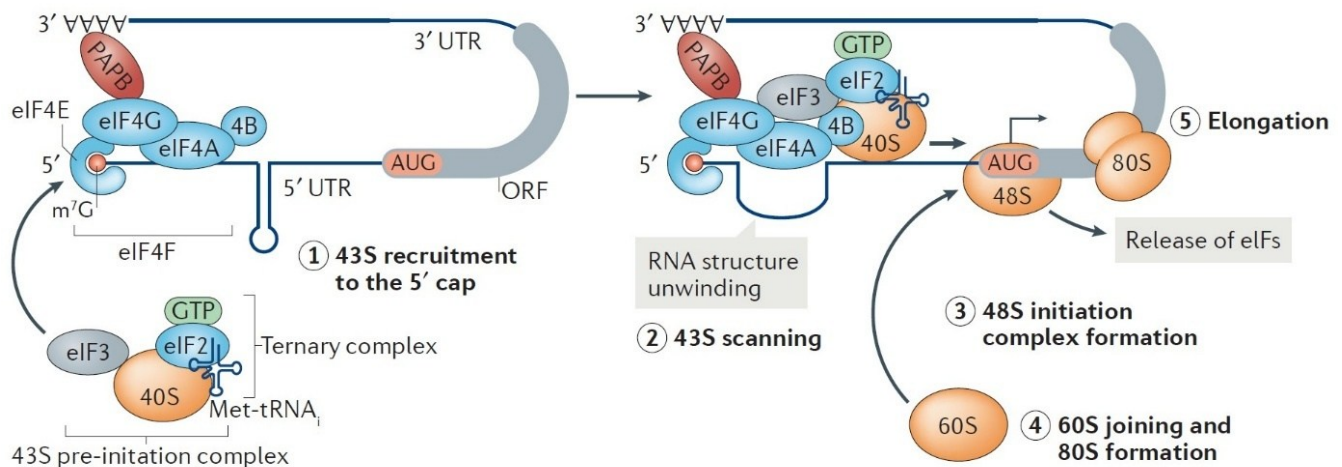


Figure 3 : L'initiation de la traduction canonique (cap-dependent translation) (Leppek et al., 2018).

Chez les eucaryotes, la majorité des ARNm sont dégradés via une voie dépendante de la dé-adénylation. La queue poly(A) est raccourcie par une activité déadénylase, assurée par le complexe CCR4-NOT ou par la PARN (poly(A)-specific ribonuclease). Cette première étape est particulière, car elle est réversible : les transcrits portant les signaux appropriés peuvent être ré-adénylés et réintégrés aux polysomes pour poursuivre la traduction (Garneau et al., 2007). Cependant, lorsqu'une cellule détermine qu'un ARNm doit être éliminé, elle active l'un des deux mécanismes irréversibles de dégradation (figure 4) : soit le decapping suivi d'une dégradation 5' → 3', soit une dégradation 3' → 5'. Dans la voie du decapping, le complexe Lsm1-7 se lie à l'extrémité 3' de l'ARNm et induit le decapping par le complexe DCP1-DCP2. Cela rend l'ARNm susceptible à la dégradation par l'exoribonucléase 5' → 3' XRN1. Alternativement, l'ARNm déadénylé (extrémité 3' non protégée) peut être dégradé dans le sens 3' → 5' par un complexe majeur appelé exosome, la coiffe restante étant hydrolysée par l'enzyme de decapping scavenger DcpS (Garneau et al., 2007; Deng et al., 2023).

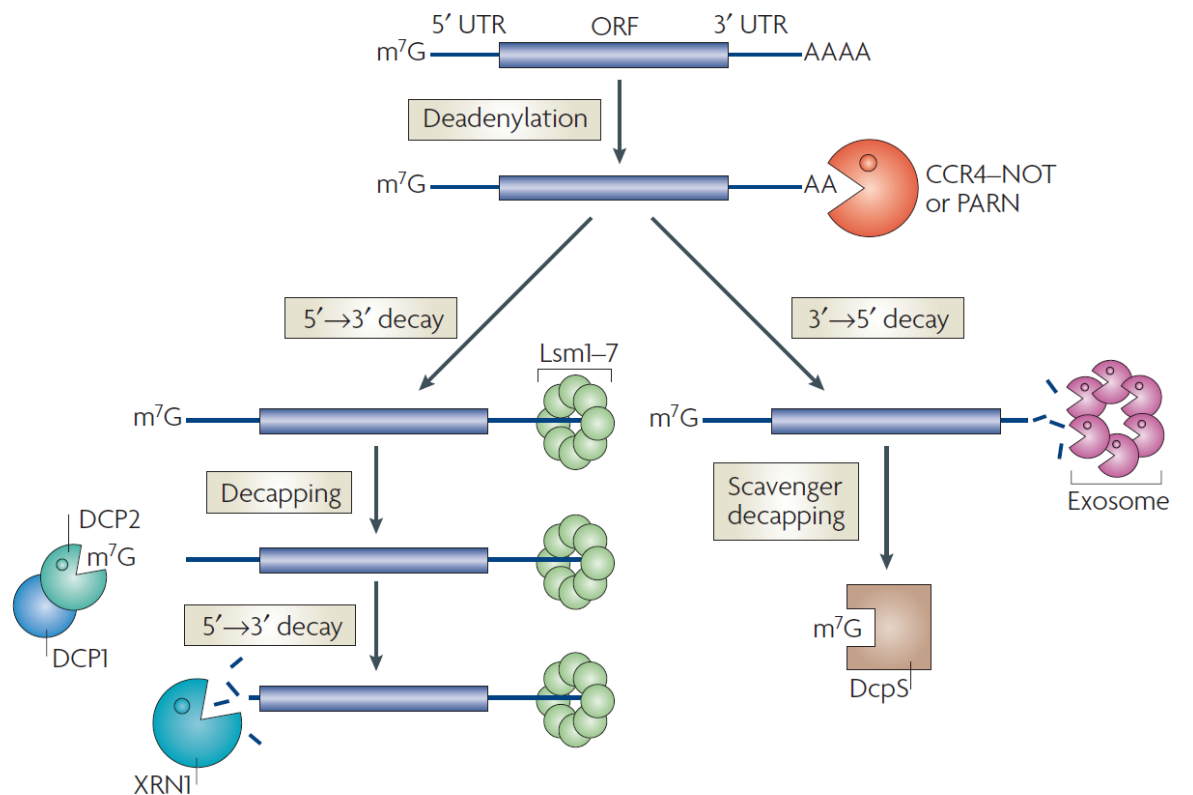


Figure 4 : Dégradation de l'ARNm dans le cytoplasme : La majorité des ARNm sont dégradés par une voie dépendante de la déadénylation. La queue poly(A) est raccourcie par une activité déadénylase assurée par le complexe CCR4-NOT ou la PARN. Deux mécanismes peuvent ensuite dégrader l'ARNm : le décaping, suivi d'une dégradation 5'→3', ou une dégradation 3'→5' (adaptée de (Garneau et al., 2007)).

La dégradation de l'ARNm par les endonucléases commence par un clivage interne de l'ARNm et peut impliquer l'IRE1² (Inositol-requiring enzyme 1), la PMR1 (Polysomal ribonuclease 1) ou la RNase MRP (Ribonuclease mitochondrial RNA processing). Ce processus génère deux fragments ayant chacun une extrémité non protégée. Ces fragments sont ensuite dégradés par la XRN1 (dégradation 5'→3') et par l'exosome (dégradation 3'→5') (Garneau et al., 2007).

Les microARN (miARN) sont une classe d'ARN non codants qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Dans la plupart des cas, ils interagissent avec la région non traduite 3' des ARNm cibles afin d'empêcher leur expression. Cependant, des interactions entre les microARN et d'autres régions, telles que

² IRE1 est une sérine/thréonine kinase bifonctionnelle et une endoribonucléase qui joue un rôle majeur dans la réponse aux protéines mal repliées (UPR) lors d'un stress du réticulum endoplasmique (RE).

la région non traduite 5' (5' UTR), ou la séquence codante ou ont également été rapportées (O'Brien et al., 2018). Selon le degré de complémentarité entre la séquence du miARN et celle de son ARNm cible, ils peuvent soit induire la dégradation de l'ARNm, soit réprimer sa traduction (Huntzinger & Izaurralde, 2011).

3. L'ARNm comme plateforme thérapeutique

L'ARNm est devenu une plateforme thérapeutique innovante qui permet l'expression intracellulaire de protéines d'intérêt, offrant ainsi des perspectives majeures pour le traitement de nombreuses pathologies, qu'elles soient liées ou non à l'immunité. Tout cela est le résultat d'un travail rigoureux de nombreux scientifiques investis depuis de nombreuses années dans l'étude de l'ARNm (figure 5). Les applications cliniques de l'ARNm se répartissent principalement en quatre catégories : vaccins, thérapies de protéin-replacement, anticorps et thérapies cellulaires et géniques à base d'ARNm.

On peut décortiquer le développement de l'utilisation de l'ARNm comme une plateforme thérapeutique en 3 grandes phases :

Phase 1 (1961-1990) : Cette phase est marquée par la découverte de l'ARNm et la maturation de la technologie de transcription *in vitro* (IVT). Au cours de cette période, d'importants progrès scientifiques ont été réalisés, notamment la traduction de l'ARNm purifié à partir de cellules de mammifères en protéines dans un système cell-free (Lockard & Lingrel, 1969), la découverte de la coiffe de l'ARNm (Muthukrishnan et al., 1975). À la fin des années 1980, la technologie de transcription *in vitro* pour la synthèse d'ARNm avait progressivement mûri avec la commercialisation des analogues de la coiffe et des ARN polymérases T7 (Sahin et al., 2014).

Phase 2 (1990-2019) : Cette phase est caractérisée par un développement rapide et par l'exploration de divers traitements thérapeutiques, notamment l'expression fonctionnelle de protéines, les vaccins contre le cancer et les maladies infectieuses. Parmi les avancées majeures figurent : L'injection directe d'ARNm synthétique codant pour la luciférase ou la chloramphénicol acétyl transférase dans le muscle squelettique de la souris a permis la traduction de ces deux protéines. L'expression de ces protéines a pu être facilement détectée, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser un système de délivrance particulier pour administrer l'ARNm (Wolff et al., 1990). Un vaccin antitumoral à ARNm a été testé chez la souris en utilisant un ARNm codant pour l'antigène carcino-

embryonnaire humain (CEA), coiffé et polyadénylé, et stabilisé par les régions non traduites 5' et 3' de la β -globine humaine. La dose utilisée était de 50 μ g deux fois par semaine, et la délivrance d'ARNm était médiée par des liposomes. Cinq des sept souris immunisées par ARNm ont présenté des anticorps anti-CEA trois semaines après l'inoculation tumorale (Conry et al., 1995). De 2004 à 2007, des chercheurs de l'université de Tübingen et de l'entreprise CureVac, en Allemagne, ont tenté pour la première fois d'injecter directement un vaccin à ARNm chez l'être humain afin de lutter contre les tumeurs du mélanome. Ils ont utilisé six ARNm codant pour des antigènes connus associés au mélanome (Melan-A, tyrosinase, gp100, Mage-A1, Mage-A3 et survivine) et ont montré que l'injection intradermique directe d'ARNm protégé par la protamine était réalisable et sûre (Etude clinique : NCT00204607, University Hospital Tuebingen, 2007). En 2005, une étude menée par Karikó *et al.*, a permis de comprendre l'impact des nucléosides modifiés sur l'immunogénicité de l'ARN. Ils ont démontré que certains ARN naturels isolés à partir de cellules de mammifères et de bactéries ainsi que des ARN transcrits *in vitro* activent les cellules dendritiques via les récepteurs Toll-like (TLR). Cette activation a été réduite, voire complètement éliminée, par l'utilisation d'ARN contenant des nucléotides modifiés naturellement, tels que m5C, m6A, m5U, pseudouridine ou 2'-O-méthyl-U (Karikó et al., 2005). Notons que les exemples évoqués ci-dessus ne constituent qu'une partie des recherches menées sur l'utilisation de l'ARNm comme plateforme thérapeutique, et que de nombreuses autres études et essais cliniques dans différentes pathologies sont décrits dans la littérature (Pour revue : Chaudhary et al., 2021; Shi et al., 2024; Žak & Zangi, 2025)

Phase 3 (2019 à présent) : Où on observe un développement rapide des thérapies à base d'ARN messenger (ARNm) aboutissant à l'approbation de deux vaccins à ARNm (Comirnaty® de Pfizer-BioNTech et Spikevax® de Moderna) pour une utilisation d'urgence par la FDA, et 43 autres vaccins à ARNm contre la COVID-19 en cours d'essais cliniques. Très récemment, en 2024, la FDA et la Commission européenne ont approuvé la mise sur le marché du vaccin à ARNm contre le virus respiratoire syncytial (VRS) (mRESVIA® produit par Moderna).

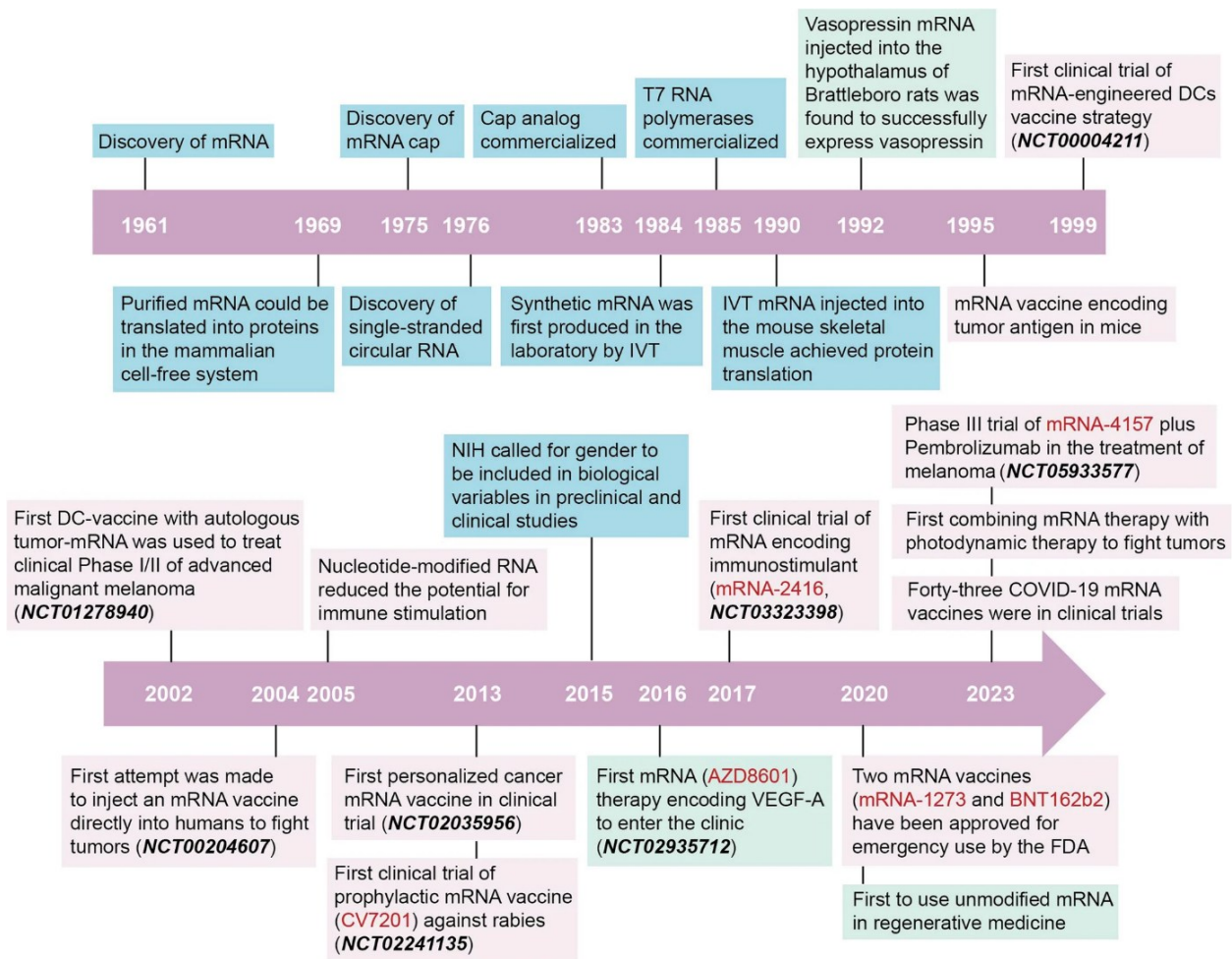


Figure 5 : Développement chronologique des thérapies à base d'ARNm. Rectangle bleu : événements clés communs au développement de la thérapie à base d'ARNm ; encadré vert : non-immunothérapie basée sur l'ARNm ; encadré rouge : immunothérapie basée sur l'ARNm (Shi et al., 2024).

4. Les applications cliniques de l'ARNm

Les thérapies à base d'ARNm apparaissent comme une approche révolutionnaire dans la médecine moderne, offrant des solutions innovantes et hautement adaptables pour un large éventail de maladies, des maladies infectieuses à l'immunothérapie. Depuis l'autorisation du premier vaccin à ARNm fin 2020 contre le SARS-CoV-2, nous avons recensé plus de 70 essais cliniques en cours utilisant l'ARNm comme plateforme thérapeutique pour diverses maladies (Žak & Zangi, 2025). Les applications cliniques de l'ARNm se répartissent principalement en quatre catégories (figure 6) : vaccins, thérapies de protéin-replacement, anticorps et thérapies cellulaires et géniques à base d'ARNm.

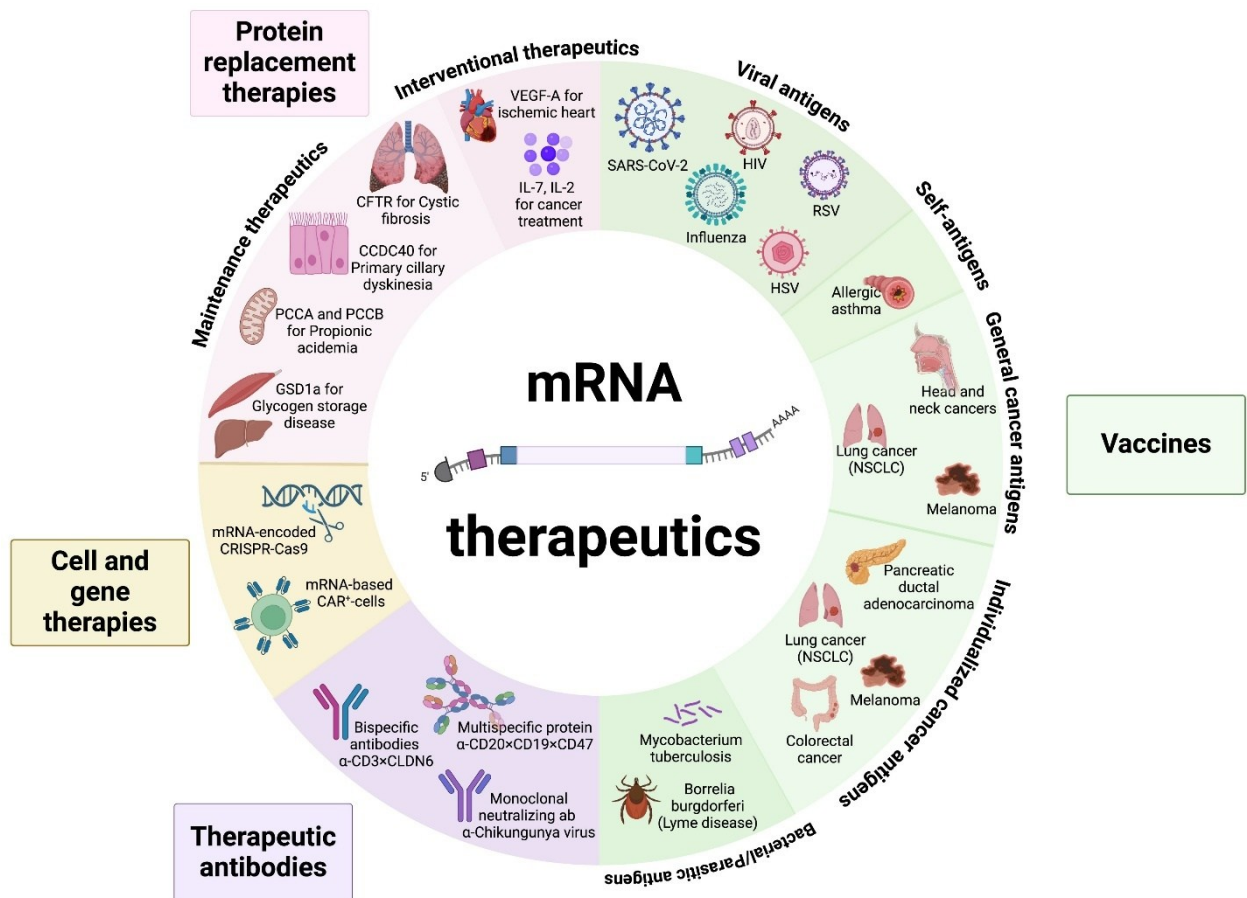


Figure 6 : Représentation schématique des classes de médicaments actuellement en essais cliniques utilisant la technologie ARNm, avec des exemples de pathologies qu'ils sont destinés à traiter (Žak & Zangi, 2025).

4.1. La vaccination à base d'ARNm

La vaccination repose sur le principe d'exposer l'organisme à un antigène, généralement sous forme de virus atténué ou inactivé avec des adjuvants, afin de stimuler le système immunitaire sans provoquer une infection. Cette exposition va déclencher la production d'anticorps et l'activation des cellules immunitaires spécifiques, créant ainsi une mémoire immunitaire qui protège l'organisme de manière efficace en cas de nouvel contact avec le pathogène.

Les vaccins à ARNm s'appuient sur ce principe, mais leur mode d'action est différent (figure 7). Brièvement, au lieu d'introduire directement un antigène, on délivre un ARNm codant pour une protéine spécifique de l'agent pathogène, comme la protéine spike du SARS-CoV-2 sous forme de nanoparticules lipidiques (LNPs) (la partie LNP sera détaillée dans le chapitre 2). L'administration intramusculaire des vaccins à base d'ARNm contre la

COVID-19 et d'autres vaccins de conception similaire entraîne l'absorption du complexe ARNm-LNP et la production de l'antigène codé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au site d'injection et dans les ganglions lymphatiques drainants (Verbeke et al., 2022). Une étape importante est l'endocytose des LNPs ARNm par les CPA, suivie par leur échappement endosomal pour éviter la dégradation de l'ARNm par le système endolysosomal (Chaudhary et al., 2021). L'ARNm libéré dans le cytoplasme à la suite de l'échappement endosomal (ce mécanisme sera détaillé dans le chapitre 2) sera traduit en protéine antigénique. La protéine antigénique traduite peut stimuler le système immunitaire de plusieurs façons : (i) L'antigène intracellulaire est dégradé par le complexe de protéasome en petits fragments antigéniques, qui sont présentés à la surface cellulaire aux lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T CD8+) par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Les lymphocytes T CD8+ activées éliminent les cellules infectées en sécrétant des molécules cytolytiques, telles que la perforine³ et les granzymes⁴. (ii) L'antigène sécrété peut être internalisé par les cellules, dégradé à l'intérieur des endosomes et présenté à la surface cellulaire aux lymphocytes T auxiliaires (lymphocytes T CD4+) par les protéines du CMH de classe II. Les lymphocytes T CD4+ facilitent l'élimination des agents pathogènes circulants en stimulant les lymphocytes B à produire des anticorps neutralisants et en activant les phagocytes, telles que les macrophages, par le biais de cytokines inflammatoires (Chaudhary et al., 2021; Verbeke et al., 2022). La revue de (Verbeke et al., 2022), décrit en détail l'activation et la réponse du système immunitaire à la vaccination par ARNm.

³ La perforine est une protéine cytolytique qui s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible, puis se polymérise pour former un canal.

⁴ Les granzymes constituent une famille de sérine-protéases présentes principalement dans les cellules du système immunitaire.

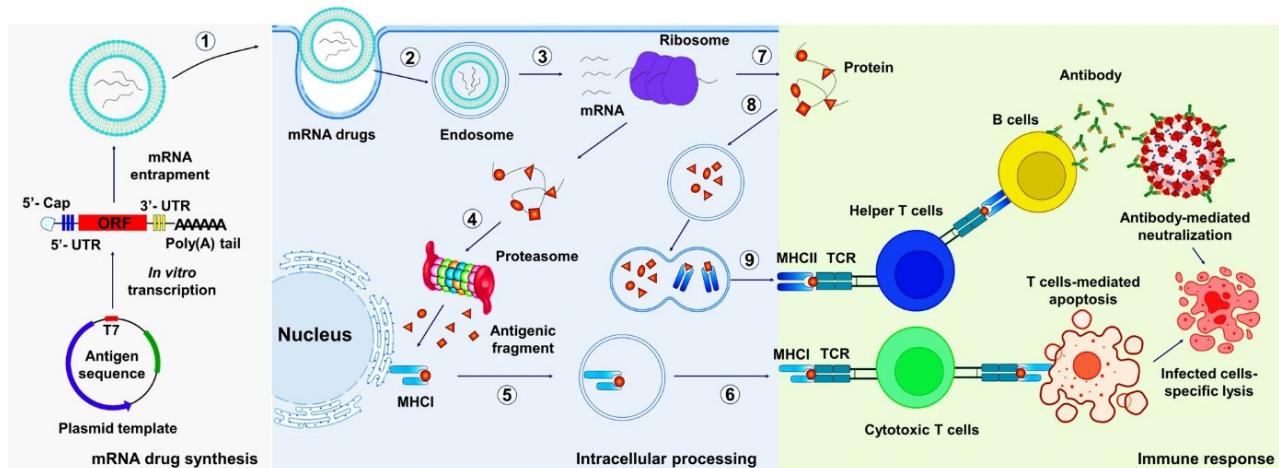


Figure 7 : Principe de vaccination à base d'ARNm : Les vaccins à base ARNm passent principalement par les trois aspects suivants : la synthèse de l'ARNm, le devenir intracellulaire d'ARNm et le déclenchement de la protection immunitaire (Qin et al., 2022). Les ARNm synthétiques sont encapsulés dans des vecteurs (tels que les LNPs) et sont internalisés par endocytose par les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques (étapes 1-2). L'ARNm est ensuite libéré dans le cytoplasme via le mécanisme d'échappement endosomal, puis traduit en protéines antigéniques par les ribosomes (étape 3). Les protéines antigéniques intracellulaires sont ensuite dégradées en polypeptides par le protéasome, puis présentées à la surface cellulaire par le CMH de classe I ce qui entraîne l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T CD8+) (étapes 4 à 6). De plus, les protéines antigéniques sécrétées peuvent être internalisées par les cellules, dégradées en fragments antigéniques à l'intérieur des endosomes et présentées à la surface cellulaire aux lymphocytes T auxiliaires par les protéines du CMH de classe II (étapes 7 à 9). Enfin, les lymphocytes T auxiliaires (lymphocytes T CD4+) stimulent les lymphocytes B afin qu'ils produisent des anticorps neutralisants dirigés contre les agents pathogènes.

Les vaccins à d'ARNm ont été conçus il y a plus de trente ans dans l'espoir de créer des vaccins sûrs et polyvalents, faciles à produire. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux vaccins conventionnels. L'un de leurs principaux avantages est qu'aucun adjuvant n'est nécessaire pour déclencher des réponses immunitaires protectrices robustes contre divers agents pathogènes. En effet, le vecteur LNP serait le principal responsable de l'adjuvantité et de la réactogénicité de ces vaccins. De plus, les vaccins à ARNm peuvent être fabriqués dans un système cell-free, ce qui permet une production rapide, évolutive et rentable. Un bioréacteur de 5 litres peut par exemple produire suffisamment d'ARNm pour près d'un million de doses de vaccin en une seule réaction. Par ailleurs, un seul vaccin à base d'ARNm peut coder plusieurs antigènes, ce qui renforce la réponse immunitaire contre les agents pathogènes résistants et permet de cibler plusieurs microbes ou variants viraux avec une seule formulation (Chaudhary et al., 2021; Kis et al., 2020; Verbeke et al., 2022).

4.2. Thérapie de protein-replacement

Thérapie de protein-replacement est un terme générique désignant les traitements médicaux qui consistent à supplémenter ou à substituer des protéines déficientes afin d'obtenir un effet thérapeutique. Traditionnellement, une telle approche nécessite une procédure de production complexe, coûteuse et longue, qui consiste à exprimer la protéine thérapeutique *in vitro* dans des cellules hôtes, puis à purifier la protéine obtenue. De plus, l'administration de protéines thérapeutiques directement dans le tissu cible est considérablement entravée par des facteurs tels que la taille des protéines, leur faible demi-vie, leur profil de glycosylation complexe et leurs propriétés biochimiques (Vavilis et al., 2023).

En revanche, les thérapies à base d'ARNm sont plus susceptibles de contourner ces difficultés et offrent une alternative quasi idéale pour l'administration de protéines thérapeutiques. Outre des coûts réduits et un processus de développement relativement simple, l'un des principaux avantages est que la protéine est traduite directement dans les cellules du patient, ce qui augmente les chances qu'elle soit correctement repliée et fonctionnelle, renforçant ainsi son efficacité thérapeutique (Vavilis et al., 2023). L'utilisation de la traduction de l'ARNm *in vivo* pour remplacer l'administration directe de protéines est actuellement un pilier de la thérapie de protein-replacement et fait l'objet de nombreuses études dans divers domaines thérapeutiques, y compris les maladies du sang et les maladies métaboliques (Shi et al., 2024).

À titre d'exemple, l'acidémie propionique (AP) est une maladie métabolique rare causée par des anomalies des sous-unités α ou β de la propionyl-coenzyme A carboxylase (PCCA ou PCCB). Elle provoque l'accumulation de métabolites toxiques et des événements de décompensation métabolique potentiellement mortels. Aucun médicament n'est actuellement approuvé pour traiter cette déficience enzymatique. Moderna est actuellement en tête des essais cliniques pour les thérapies de remplacement de protéines à base d'ARNm, avec le plus grand nombre de candidats-médicaments ciblant diverses maladies génétiques, dont l'acidémie propionique. Une approche innovante impliquant deux ARNm codant pour les sous-unités protéiques humaines normales PCCA et PCCB est entrée dans la phase I/II des essais cliniques (NCT04159103). Encapsulés dans des LNPs, ces ARNm sont spécialement conçus pour être acheminés de manière ciblée vers le foie afin de restaurer les enzymes PCC. Les résultats intermédiaires de cet essai sont

prometteurs et montrent que l'ARNm-3927 est bien toléré chez les patients atteints d'AP. Les études d'optimisation de la dose ont révélé une réduction de 70 % du risque relatif associé aux événements de décompensation métabolique (MDE), soulignant ainsi l'efficacité thérapeutique (Koeberl et al., 2024).

4.3. Anticorps thérapeutiques dérivés d'ARNm

Les anticorps monoclonaux ont révolutionné les options thérapeutiques dans les domaines de l'oncologie, de l'immunologie et des maladies infectieuses. On peut citer, par exemple, les inhibiteurs de points de contrôle pour le traitement du cancer, comme le pembrolizumab (anti-PD-1), les anticorps antiviraux ciblant le SARS-CoV-2 ou encore les traitements des maladies auto-immunes, comme le secukinumab (anti-IL-17A) pour le psoriasis. Malgré ces avancées, la production d'anticorps thérapeutiques à base de protéines reste un processus complexe et coûteux. L'utilisation de l'ARNm pour exploiter les cellules de l'hôte afin de produire des anticorps monoclonaux ou bispécifiques thérapeutiques offre donc une perspective intéressante pour des traitements plus efficaces et moins coûteux. BioNTech et Moderna ont déjà mis au point des anticorps thérapeutiques à base d'ARNm qui font actuellement l'objet d'essais cliniques.

Depuis 2017, BioNTech développe des anticorps bispécifiques thérapeutiques à base d'ARNm. Le BNT142 est un traitement à base d'ARNm codant pour un anticorps CD3/anti-CLDN6 conçu pour traiter les tumeurs solides CLDN6⁵-positives. Ces anticorps bispécifiques, qui se lient aux cellules, recrutent des lymphocytes T cytotoxiques pour les diriger vers les cellules tumorales, ce qui provoque l'activation des lymphocytes T et la lyse des cellules tumorales (Stadler et al., 2017). Dans les études précliniques menées chez la souris et les primates non humains, le BNT142 a permis d'obtenir avec succès un anticorps fonctionnel capable de maintenir des concentrations sériques thérapeutiques. Chez la souris, des injections hebdomadaires de BNT142 ont permis d'éliminer efficacement les tumeurs sous-cutanées xénogreffées humaines et d'améliorer la survie par rapport au groupe témoin. La régression tumorale était associée à un afflux de lymphocytes T et à une diminution du nombre de cellules CLDN6 positives. Le BNT142

⁵ Le CLDN6 est une protéine de jonction serrée oncofœtale qui est silencieuse après l'organogenèse fœtale et absente dans les tissus adultes sains, à l'exception du placenta. Elle est toutefois réexprimée dans diverses tumeurs solides.

fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase 1/2a (NCT05262530) (Yap et al., 2023).

4.4. Thérapies cellulaires et géniques basées sur l'ARNm

Une autre catégorie thérapeutique qui souligne la polyvalence de la plateforme d'ARNm est celle des thérapies géniques et cellulaires, comme les thérapies à base de cellules T à récepteurs antigéniques chimériques (CAR) ou l'édition génétique par CRISPR-Cas9.

Dans les thérapies CAR, le processus de fabrication ex vivo de cellules CAR-T comprend souvent plusieurs étapes, telles que le prélèvement par leucaphérèse, l'activation, l'ingénierie génétique, l'amplification et la ré-infusion des cellules T. Ce processus prend généralement plusieurs semaines, voire plusieurs mois, et son coût varie de 350 000 à 500 000 dollars américains par traitement, ce qui le rend très coûteux et technologiquement complexe (Wu et al., 2024). L'ARNm est utilisé pour délivrer les gènes codant le récepteur chimérique souhaité afin qu'il s'exprime *in vivo* sur les cellules T.

L'ingénierie des cellules immunitaires à l'aide d'ARNm codant pour des CAR offre une stratégie alternative permettant de générer des cellules CAR chez le patient, sans le risque de mutagenèse insertionnelle causé par l'intégration aléatoire du transgène (problème rencontré lors de l'utilisation d'adénovirus et de rétrovirus (Cole, 2008)). On dénombre actuellement plus de dix thérapies CAR à base d'ARNm en cours d'évaluation clinique (Wu et al., 2024). Les lymphocytes T sont les cellules immunitaires les plus utilisées pour générer des CAR T cell, mais la même stratégie s'applique aux macrophages et aux cellules NK (natural killer) pour générer respectivement des CAR M et des CAR NK (Hunter et al., 2025). À titre d'exemple, dans une étude menée par Hunter *et al.*, les chercheurs ont présenté une stratégie d'ingénierie *in vivo* utilisant des nanoparticules lipidiques ciblées (tLNP) pour administrer de l'ARNm à des sous-ensembles spécifiques de lymphocytes T afin de traiter les tumeurs malignes des lymphocytes B. Ces tLNP ont reprogrammé les lymphocytes T CD8+ à partir d'échantillons provenant de donneurs sains et de patients atteints d'une maladie auto-immune. L'administration *in vivo* a permis de contrôler la tumeur chez des souris humanisées et de réduire le nombre de lymphocytes B chez des singes cynomolgus. Chez ces derniers, les cellules B reconstituées après lymphodéplétion

étaient principalement naïves, ce qui suggère une réinitialisation du système immunitaire (Hunter et al., 2025).

Dans les thérapies d'édition génétique, l'ARNm est utilisé pour coder la protéine Cas9 et est administré avec l'ARN guide en utilisant des systèmes de délivrance tel que les LNPs par exemple. Traditionnellement, le système CRISPR-Cas9 est administré à l'aide de virus adéno-associés, de lentivirus ou sous forme de protéine, ce qui peut poser des problèmes tels que des réponses immunitaires, une expression prolongée ou des difficultés d'administration de la protéine *in vivo* (Žak & Zangi, 2025). Dans l'étude de Balsoni *et al.*, ils ont comparé des LNPs chargées d'ARNm ou de ribonucléoprotéines (RNP) afin d'introduire des outils d'édition génétique dans les couches épidermiques de la peau humaine pour une édition *in situ*. Ils ont démontré qu'il était possible de corriger une mutation pathogène avec une efficacité d'environ 5 % dans les cellules de patients atteints d'ichtyose congénitale autosomique récessive. Cette étude démontre le potentiel de cette stratégie pour le traitement des maladies cutanées monogéniques et la faisabilité d'une correction *in situ* (Bolsoni et al., 2023).

5. Production de l'ARNm par transcription *in vitro*

Un ARNm synthétique est généralement produit dans une réaction enzymatique IVT (cell-free) composée d'une matrice d'ADN double brin linéaire, de monomères de nucléoside triphosphate (NTP), d'une ARN polymérase – ADN dépendante qui transcrit l'ARNm directement à partir de la matrice d'ADN, et d'un tampon optimisé.

La matrice d'ADN utilisée en IVT est le plus souvent de l'ADN plasmidique circulaire contenant la séquence promotrice spécifique de l'ARN polymérase et la séquence d'ARNm d'intérêt. La manière dont le plasmide est linéarisé pour l'IVT, notamment le type et la concentration des enzymes de restriction sélectionnées, le tampon utilisé, la durée de la réaction et le processus de purification en aval, peut influencer la qualité de la matrice d'ADN et, par conséquent, de l'ARNm transcrit (Lenk et al., 2024). Alternativement, l'ADN amplifié par PCR peut servir de matrice efficace pour la réaction d'IVT.

Actuellement, l'ARN polymérase la plus largement utilisée est l'ARN polymérase du bactériophage T7. Le choix de l'ARN polymérase peut influencer la qualité de la réaction IVT. Idéalement, l'ARN polymérase devrait avoir une fidélité élevée, un rendement transcriptionnel et une activité complète dans des conditions de réaction variables et la

capacité d'incorporer des NTP modifiés avec une grande fidélité. L'ARN polymérase T7 reconnaît le promoteur T7 de la matrice d'ADN et initie la transcription de l'ARNm.

La structure 5' cap de l'ARNm IVT peut être ajoutée de deux manières : co- ou post-transcriptionnelle. Pour le capping co-transcriptionnel, des analogues de la coiffe peuvent être ajoutés au mélange réactionnel, parmi lesquels l'ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) ou des trinucleotides cap analogues, comme le CleanCap® Reagent AG (3'-O-Me), commercialisé pour la première fois par TriLink et utilisé dans l'ARNm du vaccin contre la Covid-19 de Pfizer-BioNTech. L'ARCA est l'équivalent de Cap0 et le CleanCap AG, de Cap1. Pour le capping post-transcriptionnel, une coiffe 5' peut être ajoutée par voie enzymatique à l'aide d'une ARN triphosphatase, d'une guanylyltransférase et d'une guanine méthyltransférase pour former d'abord Cap0, puis, avec l'ajout ultérieur d'une ARN cap 2'O-méthyltransférase, Cap1 (figure 2).

De même, La queue poly A de l'ARNm IVT peut être synthétisée par deux méthodes différentes. Bien qu'une queue poly(A) soit souvent directement codée par la matrice, elle peut également être ajoutée ou prolongée après la transcription à l'aide de la polymérase poly(A). Cependant, cette méthode présente l'inconvénient que la longueur de la queue poly A n'est pas homogène parmi les ARNm IVT produits (Kwon et al., 2022). Le rendement et la qualité de l'ARNm, y compris les quantités de sous-produits de la réaction IVT, dépendent fortement des rapports stœchiométriques des ingrédients, des paramètres physiques de la réaction (pH, température, etc.) et de la durée de la réaction. Les sous-produits de la réaction comprennent notamment l'ARN double brin (dsRNA), l'ARNm non coiffé (uncapped mRNA), l'ARNm abortif et l'hybride ARN : ADN (voir la figure 8). Un processus de purification est nécessaire après la réaction IVT. Plusieurs méthodes permettent d'obtenir un ARNm purifié et de haute qualité. Celles-ci ont prouvé leur

efficacité pour éliminer à la fois les impuretés liées au processus de réaction et les sous-produits (Karikó et al., 2011).

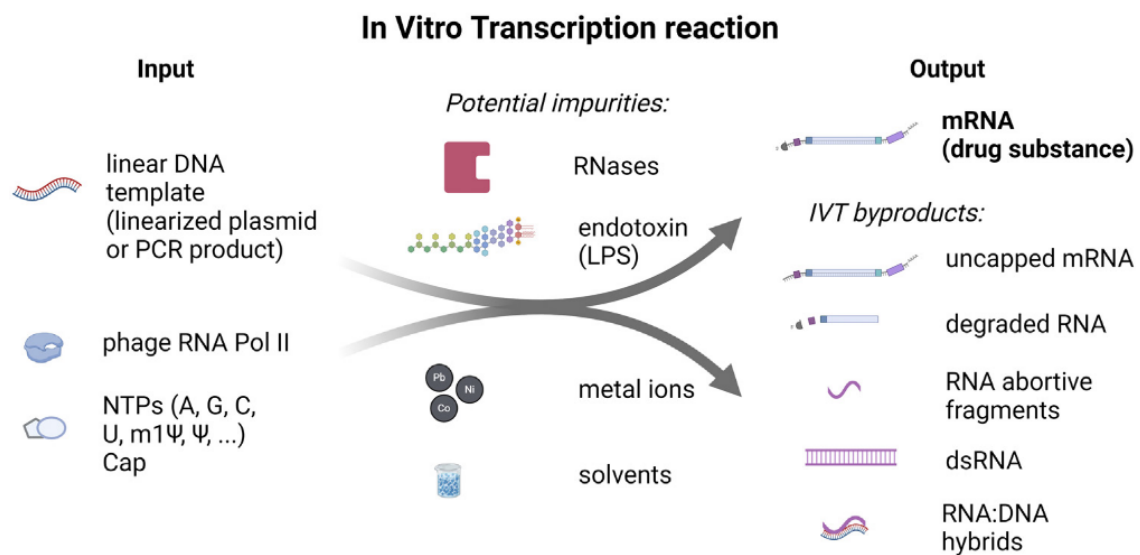


Figure 8 : La transcription in vitro : à gauche les ingrédients nécessaires pour la réaction et à droite le produit et les sous-produits de la réaction (Lenk et al., 2024).

En laboratoire de recherche, l'ARNm est généralement précipité à l'aide d'alcool et de sels de sodium ou d'ammonium, de chlorure de lithium, ou à l'aide de kits de purification commerciaux reposant sur des colonnes de silice. Des billes magnétiques Oligo (dT) peuvent être utilisées pour capturer l'ARNm en formant des liaisons avec sa queue poly(A), ce qui permet de récupérer l'ARNm dans son intégralité. Malgré ces méthodes de purification, la solution peut encore contenir de l'ARN double brin, qui peut déclencher une réponse immunitaire innée contre l'ARNm, et doit donc être combinée à d'autres purifications en aval. Les colonnes à base de cellulose, par exemple, ont prouvé leur efficacité pour réduire considérablement la contamination par l'ARN double brin (Baierdörfer et al., 2019). La production d'ARNm à grande échelle peut toutefois intégrer diverses méthodes de purification de l'ARNm chromatographiques ou non chromatographiques, qui peuvent également être combinées (largement examiné dans (Baronti et al., 2018; J. Zhang et al., 2023)).

6. Immunogénicité innée de l'ARNm synthétique

Le système immunitaire de l'hôte reconnaît les infections virales et y répond. Les principaux acteurs de la réponse immunitaire innée à l'infection virale sont les pattern

recognition receptors (PRRs), qui ciblent l'ADN et l'ARN génomiques viraux, tels que l'ARN simple brin (ssRNA) et l'ARN double brin (dsRNA). L'activation des PRRs provoque des cascades de transduction de signaux qui conduisent à la sécrétion de cytokines et peut finalement entraîner l'activation du système immunitaire et, dans certains cas, même la mort cellulaire (figure 9). À l'instar des acides nucléiques viraux, les vaccins et les traitements à base d'ARNm activent le système immunitaire par le biais des mêmes mécanismes basés sur la reconnaissance des PRRs (Vlatkovic, 2021).

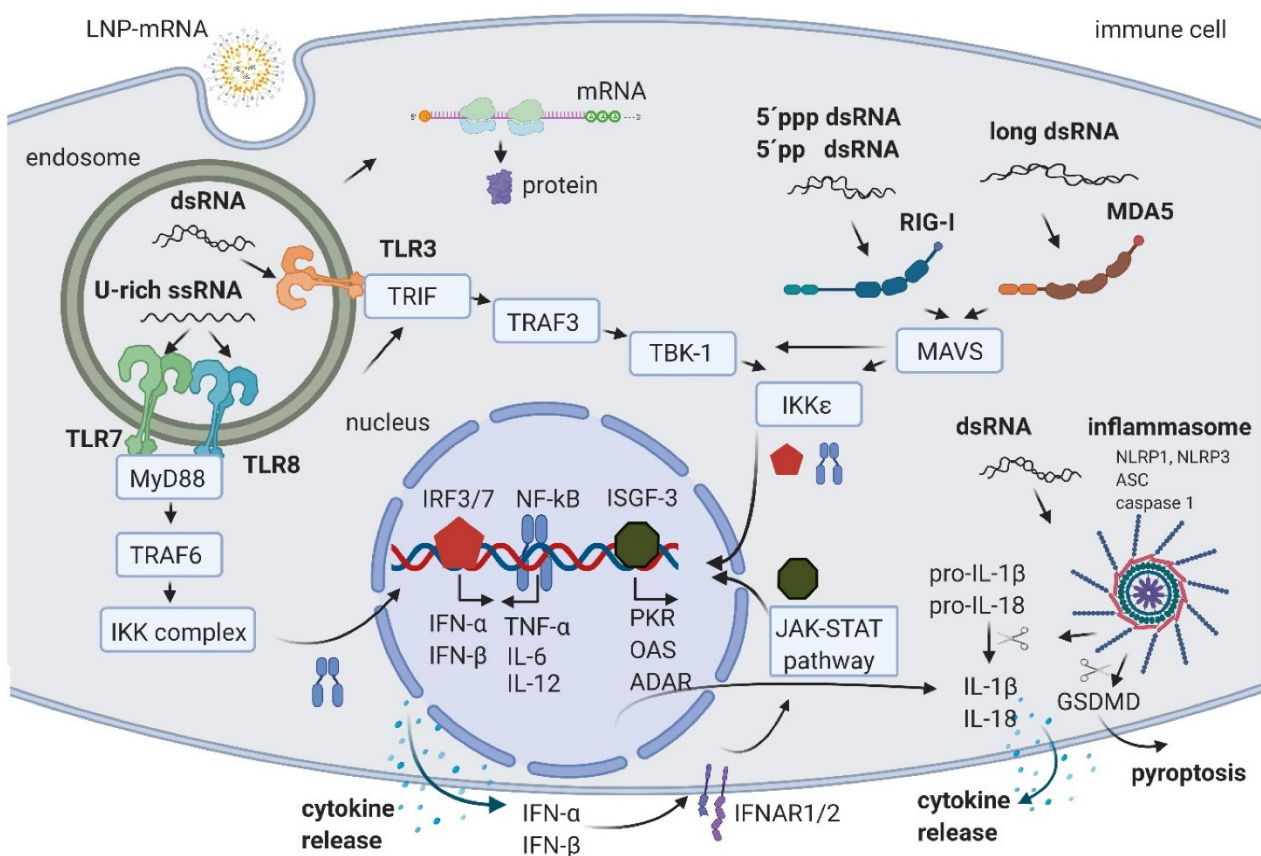


Figure 9 : Schéma de l'activation immunitaire induite par l'ARN. L'ARNm-LNP est endocyté par des mécanismes spécifiques aux cellules. De petites fractions d'ARNm et des sous-produits de la réaction IVT sont libérés dans le cytoplasme par échappement endosomal (adapté de (Vlatkovic, 2021)).

Les récepteurs Toll-like (TLR) peuvent reconnaître l'ARNm exogène au niveau endosomal. Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin d'une longueur comprise entre 40 et 45 pb. De plus, les TLR7 et TLR8 reconnaissent les régions riches en GU de l'ARNm simple brin. Les PRRs qui reconnaissent l'ARNm exogène dans le cytosol comprennent le gène MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5), le gène RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) et la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR). Le MDA-5 et le RIG-I

reconnaissent les ARN double brin d'une longueur supérieure à 2 kb et les ARN double brin courts 5'-triphosphate, respectivement.

Ces PRRs activent généralement la voie de l'interféron de type I. La sécrétion des interférons α et β , qui appartiennent à la famille des interférons de type I, provoque une augmentation de la protéine kinase R (PKR) et de l'oligoadénylate synthétase (OAS). La PKR est une sérine-thréonine kinase qui agit également comme un capteur d'ARN double brin et bloque la traduction de l'ARNm en phosphorylant le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2). L'OAS est également un capteur d'ARN double brin qui active la RNase L pour dégrader l'ARNm. Par conséquent, la traduction de l'ARNm synthétique exogène ainsi que son efficacité thérapeutique seront considérablement réduites.

Pour pallier l'activation potentielle du système immunitaire par l'ARNm synthétique et les sous-produits de l'IVT, différentes méthodes de purification évoquées précédemment ont été optimisées et utilisées pour éliminer les impuretés et les sous-produits et obtenir ainsi un ARNm synthétique de haute qualité. Cependant, cela n'est pas suffisant, car l'ARNm est exogène et immunogène pour la cellule hôte. Une approche initiée en 2005 par (Karikó et al., 2005) consiste à incorporer des nucléosides modifiés dans l'ARNm synthétique afin de le rendre moins immunogène et d'améliorer son potentiel thérapeutique. Ils ont observé que le potentiel d'activation des ARN était inversement proportionnel au taux de nucléosides modifiés, car l'ARN bactérien et l'ARN mitochondrial, qui ne contiennent que quelques modifications, sont les activateurs les plus puissants des cellules dendritiques. En revanche, les ARN extrêmement modifiés n'activent pas ou peu ces cellules. Ils ont démontré que l'utilisation de ces nucléosides modifiés diminuait la reconnaissance des ARNm exogènes par les senseurs de l'immunité innée de la cellule (Karikó et al., 2005). De plus, les nucléosides modifiés, notamment le Ψ , le $m_1\Psi$ et le m_5C , peuvent réduire la production d'ARN double brin lors du processus de transcription *in vitro* (Mu et al., 2018).

7. Optimisation de l'ARNm synthétique

L'ARNm synthétique destiné à des fins thérapeutiques est généralement conçu en s'inspirant de l'ARNm eucaryote. Les éléments structuraux de l'ARNm transcrit *in vitro* (IVT) comprennent une coiffe 5', une région non traduite 5' (5' UTR), une région codante, une région non traduite 3' (3' UTR) et une queue poly(A). Dans cette section, nous

aborderons les avancées récentes utilisées pour optimiser les composants structuraux de l'ARNm synthétique pour améliorer sa stabilité et sa traduction.

7.1. La coiffe en extrémité 5'

Deux stratégies sont couramment utilisées pour ajouter une coiffe 5' aux ARNm transcrits *in vitro* : le capping post-transcriptionnel via une réaction multi-enzymatique en deux étapes et le capping co-transcriptionnel.

Le capping post-transcriptionnel ou l'approche du coiffage enzymatique intègre deux enzymes spécifiques : la vaccinia capping enzyme (VCE) et l'ARN 2'-O-méthyltransférase. La VCE se compose de deux sous-unités : D1 et D12. La sous-unité D1 possède trois activités enzymatiques : la RNA triphosphatase (TPase), la guanylyltransférase (GTase) et la guanine-N7-méthyltransférase (MTase). Le phosphate terminal est éliminé et GMP (guanosine monophosphate) est ajouté pour former du GpppN. La sous-unité D12 active ensuite la MTase, qui méthyle le GpppN en position 7'-N pour former le m⁷GpppN, l'équivalent de cap0. Le premier nucléotide transcrit peut alors être méthylé en position 2'-O du ribose (m⁷GpppNm) par la 2'-O-méthyltransférase, pour former cap1 (Z.-R. Wang et al., 2025). Malgré l'avantage de former le cap1, cette méthode nécessite la production et la purification coûteuses des enzymes de capping. De plus, elle ajoute une étape de purification supplémentaire aux ARNm transcrits *in vitro*.

Le capping co-transcriptionnel, ou stratégie chimique, consiste à introduire des analogues de coiffe durant la synthèse de l'ARNm. L'ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) est l'un des analogues de coiffe de première génération les plus utilisés. Il a été conçu pour garantir une incorporation correcte. Cet analogue est méthylé en 3'-OH du ribose de la 7-méthylguanosine, ce qui empêche l'élongation dans l'orientation inversée et garantit ainsi l'incorporation exclusive des ARCA dans l'orientation correcte. Les ARNm coiffés avec de l'ARCA présentent une efficacité de traduction supérieure à celle des ARNm non coiffés ou coiffés avec m⁷G classique. L'inconvénient de l'ARCA est que son efficacité d'incorporation durant la transcription est d'environ 80 %, en raison de la compétition avec le GTP pour l'ARN polymérase. De plus, l'analogue ARCA présente une caractéristique de cap 0 et ne peut pas être modifié pour générer des structures de cap 1 ou de cap 2. Les analogues de coiffe de deuxième génération ou trinucleotide cap analogs. Il s'agit de cap 1, comme m⁷GpppAmpG, dont le G non méthylé, situé après le 2'-O-méthyl-A, permet à la chaîne

d'ARNm d'être prolongée à partir du G terminal, car son 2'-OH permet l'ajout du nucléotide suivant. Cet analogue de coiffe, qui initie la transcription de l'ARNm, n'entrera pas en compétition avec le GTP pour l'initiation de la chaîne, ce qui permet d'améliorer l'efficacité du coiffage (> 95%) et le rendement de l'IVT par rapport à l'ARCA. TriLink a été le premier à commercialiser cet analogue de coiffe sous le nom de CleanCap® Reagent AG. Le premier rapport sur la structure du m7GpppmApG a toutefois été publié par Yamaguchi *et al.*, en 1984 (Yamaguchi et al., 1984). Un variant de cet analogue, le CleanCap® Reagent AG (3'-O-Me), a servi à fabriquer le vaccin contre la COVID-19 de Pfizer/BioNTech (Sahin et al., 2020). CleanCap® M6, ou CleanCap m6AG (3' OMe) (m7G3'OMepppm6A2'OMe pG), est le tout dernier analogue de cap et le plus robuste de la famille de la technologie brevetée CleanCap® de TriLink (Mandell et al., 2025). De son côté, Arterna a développé un large catalogue de cap analogues (<https://arterna.com/mrna-raw-materials/cap-analogs/>).

D'autres stratégies ont été utilisées par les chercheurs, telles que le multicapping ou l'utilisation d'analogues de 5' cap photocleavable.

Dans l'étude menée par Chen *et al.*, ils décrivent une méthode permettant d'augmenter la traduction, appelée ligation-enabled mRNA-oligonucleotide assembly (LEGO). Ils ont optimisé plusieurs paramètres, comme les modifications de l'analogue de la coiffe, de la base, du sucre, et la longueur du linker, etc. Ils ont ainsi généré un ARNm à double coiffe dont la traduction a multiplié par dix la production de la protéine Spike *in vivo*, permettant d'obtenir une production d'anticorps 17 fois plus élevée après injection de doses initiales et de rappel dans le cadre d'un vaccin contre le SARS-CoV-2 chez la souris. Selon les auteurs, la plateforme LEGO ouvre de nouvelles possibilités pour concevoir des structures et des topologies d'ARN non naturelles, au-delà des ARN linéaires et circulaires canoniques, tant pour la recherche fondamentale que pour les applications thérapeutiques (Chen, Liu, Aditham, et al., 2025). Afin d'obtenir un contrôle spatio-temporel de la traduction de l'ARNm thérapeutique, le groupe d'Andrea Rentmeister ont développé un analogue synthétique de la coiffe (appelé FlashCap) qui interfère efficacement avec la phase d'initiation de la traduction. L'irradiation des ARNm FlashCap libère la molécule d'ARNm dont la structure de la coiffe n'est pas altérée et qui peut être traduite en des centaines de copies de protéines (Klöcker et al., 2022). Ces solutions innovantes d'ingénierie de cap analogues synthétiques non naturels sont, selon moi, loin

de passer en clinique et ne restent pour le moment applicables qu'à l'échelle de la recherche.

7.2. Les régions non traduites 5' et 3' UTR

Une autre stratégie visant à optimiser la traduction et la stabilité de l'ARNm IVT dans les cellules consiste à incorporer des régions 5' et 3' UTR contenant des éléments de séquence régulateurs ayant été identifiés comme modulant la traduction et la stabilité de l'ARNm endogène. L'efficacité traductionnelle, souvent définie comme le nombre de molécules protéiques produites par molécule d'ARNm par unité de temps, est un critère important.

Pour augmenter l'efficacité et la stabilité de l'expression des ARNm synthétiques, deux stratégies sont possibles :

La première consiste à utiliser les UTR provenant de gènes cellulaires endogènes hautement traduits, exprimés de manière constitutive et stable. Afin d'obtenir une efficacité de traduction élevée, de nombreuses thérapies à base d'ARNm utilisent les UTR 5' et 3' bien étudiés des gènes humains de α et de β -globine. On pense que la région 5' UTR de l'ARNm de l'alpha ou de la bêta-globine assure une traduction efficace dépendante de la coiffe, en raison de l'absence de structures secondaires stables ou d'éléments réprimant la traduction (Babendure et al., 2006). En effet, l'efficacité de la traduction dépend de la stabilité et de la position des éléments de structure secondaire (par exemple, hairpins) dans cette région. Les structures secondaires stables dans la 5' UTR peuvent affecter l'efficacité de la traduction de l'ARNm en empêchant la liaison du complexe d'initiation de la traduction (PIC) 43S à l'ARNm, ce qui constitue une étape limitante de l'initiation de la traduction (Babendure et al., 2006). Il a également été démontré que les structures secondaires de type hairpins situées à proximité de la coiffe 5' réprimaient fortement la traduction (Kozak, 1989). Il est donc nécessaire de prendre en compte la présence ou non des structures secondaires dans la région 5' UTR lors du choix de l'UTR pour un ARNm thérapeutique. De nombreux ARNm synthétiques contiennent la 3' UTR des ARNm α - ou β -globine qui abritent plusieurs éléments de séquence qui augmentent la stabilité et la traduction de l'ARNm (Sahin et al., 2014). La 3' UTR de l'alpha-globine a par exemple été utilisée dans le vaccin à ARNm de Moderna contre le SARS-CoV-2 (Xia, 2021). L'effet stabilisateur des séquences 3' UTR de la β -globine humaine est encore renforcé par

l'utilisation de deux séquences 3' UTR de la β -globine humaine disposées dans une orientation head-to-tail (Sahin et al., 2014) (Volkhin et al., 2025). Outre les UTR de la α - et de la β -globine, largement utilisées, celles d'autres gènes peuvent également être incorporées dans les ARNm utilisés dans les thérapies à base d'ARNm. Il a été démontré que certaines UTR naturelles améliorent la traduction et la stabilité des ARNm synthétiques, et donc l'efficacité des traitements correspondants. C'est le cas du 3' UTR AES-mtRNR1, utilisé dans le vaccin à ARNm contre le SARS-CoV-2 de Pfizer-BioNTech, identifié par une approche de criblage cellulaire à partir de cellules dendritiques humaines (Niessen et al., 2019). Il s'agit d'une combinaison de deux gènes : AES (Amino Enhancer of Split) et mtRNR1 (ARN mitochondrial 12S). D'autres exemples sont présentés dans la littérature, dont une grande partie est répertoriée dans la revue (Volkhin et al., 2025).

La deuxième méthode consiste à utiliser de nouvelles méthodes computationnelle et machine learning pour générer artificiellement des UTR présentant des propriétés spécifiques, afin d'améliorer la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de la production de protéines par rapport aux UTR endogènes naturels (Sample et al., 2019a). La plupart des études utilisent un réseau de neurones convolutionnels (CNN : convolutional neural network) pour prédire le recrutement moyen des ribosomes au 5' UTR (MRL : Mean Ribosome Load). D'autres stratégies sont résumées dans la revue de (Volkhin et al., 2025). Ces méthodes de prédiction computationnelle pour la génération d'UTR synthétiques performants nécessitent des méthodes de haut débit pour la validation *in cellulo*. La MPRA (Massively Parallel Reporter Assay), par exemple, permet d'évaluer à haut débit les séquences UTR à l'aide de bibliothèques d'ARNm synthétiques contenant un grand nombre de variantes d'UTR (Zheng & VanDusen, 2023). Chaque ARNm est associé à un code-barres ADN unique incorporé dans le transcrit rapporteur. Les cellules sont transfectées avec la bibliothèque contenant plusieurs milliers d'ARNm, dont les plus efficaces sont sélectionnés par polysome profiling ou d'autres méthodes, afin d'enrichir les ARNm activement traduits (Sample et al., 2019b; Volkhin et al., 2025). Un séquençage de l'ARN peut ensuite être effectué pour identifier les variants présentant une efficacité de traduction élevée du transcrit rapporteur. Cette approche permet d'étudier simultanément de nombreux UTR afin d'identifier les éléments de séquence qui régulent l'efficacité de la traduction et la stabilité de l'ARNm.

En résumé, il n'existe pas de méthode standard pour sélectionner des UTRs pour une application thérapeutique donnée. Cependant, plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de la conception de séquences UTR afin d'optimiser la traduction et la stabilité de l'ARNm synthétique. Concernant la 5' UTR, il a été démontré qu'une conception efficace de cette région nécessitait la formation d'une région moins structurée en amont du codon d'initiation, afin de favoriser l'initiation de la traduction en améliorant l'accessibilité du ribosome. Il faut éviter la présence d'un uORF (Upstream ORF) dans la 5'UTR, car il a été démontré qu'il a un fort effet inhibiteur sur la traduction (Hinnebusch et al., 2016). Pour la 3' UTR, la présence de sites de liaison aux protéines peut impacter l'efficacité de la traduction et/ou la stabilité de l'ARNm. La présence de sites de fixation de microARN peut influencer la stabilité de l'ARNm. De plus, l'évaluation des UTR sélectionnés avec l'ORF du gène d'intérêt est très importante, car il n'est pas garanti de pouvoir extrapoler d'un gène rapporteur GFP ou luciférase à une autre ORF.

7.3. La séquence codante

La séquence codante est particulièrement importante pour le développement de thérapies à base d'ARNm codant un antigène ou une protéine d'intérêt. Cette région constitue généralement une grande partie du transcrit d'ARNm, il n'est donc pas surprenant que la modulation de cette région, en particulier dans le cadre de l'optimisation des codons, influence la stabilité globale de l'ARNm et sa capacité de traduction. La composition en codons est connue pour influencer l'efficacité de la traduction. Le remplacement de codons rares par des codons synonymes fréquents améliore le rendement traductionnel, car la réutilisation du même ARNt accélère la traduction grâce à l'aminacylation des ARNt à proximité des ribosomes. Le contexte du codon (c'est-à-dire les nucléotides et codons voisins) influence également la vitesse d'élongation et l'efficacité de la traduction (Cannarozzi et al., 2010). Des ARNm synthétiques optimisés en codons ont été utilisés avec succès dans le cadre d'études vaccinales contre des infections virales comme le SARS-CoV-2. Toutefois, il existe des raisons valables de ne pas utiliser de codons optimisés. En effet, certaines protéines nécessitent une traduction lente assurée par des codons rares pour permettre un repliement correct. Il peut également être bénéfique de conserver l'ORF d'origine pour certains vaccins à ARNm (Sahin et al., 2014). Il convient de noter que les séquences naturelles présentent de faibles fréquences de paires de codons dites « unwanted », tandis

que les séquences optimisées par l'indice d'adaptation des codons (CAI) en contiennent davantage. Le modèle GEMORNA (Generative models for RNA) développé par l'équipe de Cao, basé sur l'intelligence artificielle (IA), a montré une réduction marquée de l'incidence des paires de codons « unwanted » dans les CDS synthétiques (H. Zhang et al., 2025). En résumé, il est important d'évaluer avec soin l'optimisation globale des codons et des nucléosides modifiés afin d'analyser les mécanismes de traduction dynamiques pour différentes séquences (Kang et al., 2023).

7.4. La queue poly(A)

Il existe deux stratégies pour synthétiser le poly(A) dans les ARNm. La première consiste à prolonger l'ARNm IVT par une réaction enzymatique avec une poly(A) polymérase recombinante. Bien que cela permette d'incorporer des nucléosides modifiés dans la queue poly(A), cette méthode ne permet pas de contrôler et de déterminer avec précision la longueur de la queue, ce qui est souvent souhaitable pour les applications cliniques (Kang et al., 2023). La deuxième possibilité consiste à coder de longs segments de A dans le vecteur matrice d'ADN. Cela garantit une longueur hautement contrôlée de la queue poly(A) résultante. Cependant, la présence de la queue poly(A) sur l'ADN plasmidique pour la production d'ARNm n'est pas stable et a tendance à se raccourcir dans les bactéries pendant l'amplification de l'ADN plasmidique. BioNTech a démontré que des séquences poly(A) de 30 et 70 adénosines séparées par un linker de 10 nt (queue A30L70) donnaient des queues poly(A) plus stables sur l'ADN plasmidique (EBERLE et al., 2016). En général, une queue poly(A) avec une longueur, comprise entre 120 et 150 nt, rend l'ARNm plus stable, car la longue séquence protège la région codante de l'ARNm contre les enzymes de déadénylation et de dégradation (Sahin et al., 2014). Cependant, la déadénylation dynamique et le mécanisme de régulation de la queue poly(A) révèlent que cela n'est pas toujours vrai. Il existe des ARNm stables avec une queue poly(A) courte (Kang et al., 2023). Une technique de séquençage complet de l'ARNm, qui permet de séquencer avec précision les transcrits de l'ARNm, y compris la queue poly(A), a révélé que d'autres nucléosides que l'adénosine sont incorporés dans la queue (Legnini et al., 2019). Li *et al.*, ont rapporté que l'incorporation de nucléosides cytidine dans les queues a amélioré la traduction des protéines et prolongé la stabilité de l'ARNm synthétique *in vitro* et *in vivo* en protégeant les ARNm synthétiques de la déadénylation par le complexe de transcription CCR4-NOT, car les protéines CNOT ont une efficacité moindre pour

éliminer la cytidine (Li et al., 2022). Lim *et al.*, ont identifié des enzymes (TENT4A et TENT4B) capables d'incorporer des résidus non-A (G, U ou C) dans la queue poly(A), avec une préférence pour la guanosine, ce qui donne une queue poly(A) hétérogène. Les déadénylases raccourcissent les queues poly(A) pour initier la dégradation de l'ARNm, mais s'arrêtent au niveau des résidus non-A. Un seul résidu de guanosine suffit à empêcher le complexe déadénylase CCR4-NOT, qui dégrade la queue et expose la guanosine à l'extrémité 3'. En effet, la queue hétérogène stabilise les ARNm en ralentissant la déadenylation (Lim et al., 2018). Nous avons utilisé cette stratégie de queue hétérogène dans le cadre de notre étude d'optimisation de l'ARNm synthétique.

Une nouvelle stratégie permettant d'obtenir une expression durable d'ARNm thérapeutique consiste à incorporer une queue poly(A) ramifiée appelée « multitail ». Cette queue a été mise au point par l'équipe de Xiao Wang. Ils ont démontré que l'ARNm multitailed optimisé produisait des signaux de luminescence environ 4,7 à 19,5 fois plus élevés que l'ARNm témoin (avec une queue classique) entre 24 et 72 heures après la transfection des cellules HeLa, et que ce signal était détectable pendant 14 jours *in vivo*, contre moins de 7 jours pour le témoin (Chen, Liu, Guo, et al., 2025).

Le succès des vaccins à base d'ARNm ne tient pas seulement à l'ingénierie de la séquence de l'ARNm synthétique, mais aussi aux systèmes de délivrance lipidique. Nous avons évoqué dans le premier chapitre le développement de l'ARNm en tant qu'outil thérapeutique. Il convient de noter qu'en parallèle du développement de l'ARNm, il y a eu un développement des systèmes de délivrance pour les acides nucléiques, notamment les systèmes non viraux lipidiques, que nous aborderons dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Vectorisation et délivrance d'ARNm par les nanoparticules lipidiques

Le choix d'un système de délivrance approprié est essentiel pour garantir l'efficacité des thérapies à base d'acides nucléiques. Au fil des années, divers systèmes de délivrance ont été développés, qui peuvent être classés en trois grandes catégories : les méthodes physiques, les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Les vecteurs non viraux se sont révélés être des outils puissants dans le domaine de la thérapie génique, offrant une alternative aux vecteurs viraux pour la délivrance sûre et efficace d'acides nucléiques (ADN, ARNm, siRNA, miRNA ou oligonucléotides antisens (ASO)). Les nanoparticules inorganiques, les dérivés de polymères et de peptides, ainsi que les vecteurs à base de lipides, sont les nano-vecteurs non viraux les plus répandus pour la délivrance d'acides nucléiques.

Le succès des vaccins à base d'ARNm contre la COVID-19 est dû non seulement à l'ingénierie de la séquence de l'ARNm, comme évoqué dans le chapitre précédent, mais aussi aux nanoparticules lipidiques qui ont permis de le vectoriser et de le délivrer aux cellules.

L'ARNm seul est très faiblement internalisé par les cellules en raison de sa charge négative et de son poids moléculaire élevé. Les vecteurs protègent l'ARNm des nucléases et assurent sa délivrance aux cellules cibles. Depuis six décennies, de nombreux systèmes de délivrance lipidiques ont été étudiés et développés pour assurer la délivrance des acides nucléiques, et plus particulièrement de l'ARNm. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux systèmes de délivrance lipidiques et aborderons en détail les nanoparticules lipidiques (LNPs) destinées à la délivrance de l'ARNm à des fins thérapeutiques, de leur découverte à leur utilisation clinique.

1. La découverte et le développement des nanoparticules lipidiques

Le développement des systèmes de délivrance lipidique pour les acides nucléiques s'étend sur six décennies. Des efforts considérables ont été consacrés à la recherche et au

développement dans ce domaine, tant dans le monde académique qu'industriel (figure 10).

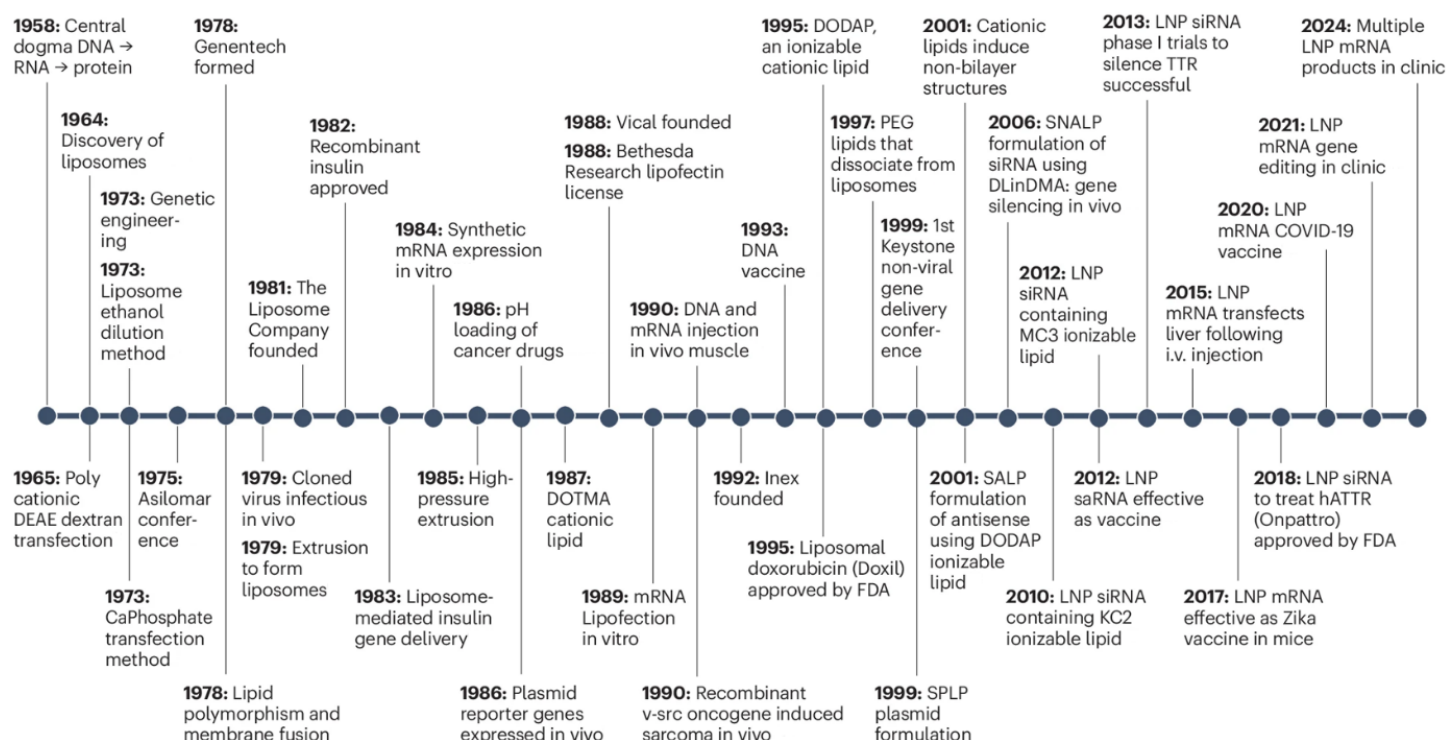


Figure 10 : Chronologie des avancées majeures en formulation ayant permis le développement des vaccins et thérapies à ARN selon les Dr Cullis et Felgner (Cullis & Felgner, 2024).

Ce long parcours a commencé par la découverte des liposomes par le chercheur Alec Douglas Bangham en 1964 à l'Institut Babraham de Cambridge (Bangham, 1993). Les liposomes sont composés de lipides qui s'auto-assemblent pour former une particule sphérique. Ils possèdent une bicouche lipidique et peuvent être uni-lamellaires ou multi-lamellaires (figure 11).

En 1978, des chercheurs ont démontré l'utilisation de liposomes pour délivrer de manière sélective de l'ARNm fonctionnel dans des cellules eucaryotes différenciées *in vitro*, et que l'ARNm codant pour la globine ainsi délivré avait induit l'expression de la protéine (Dimitriadis, 1978; Ostro et al., 1978).

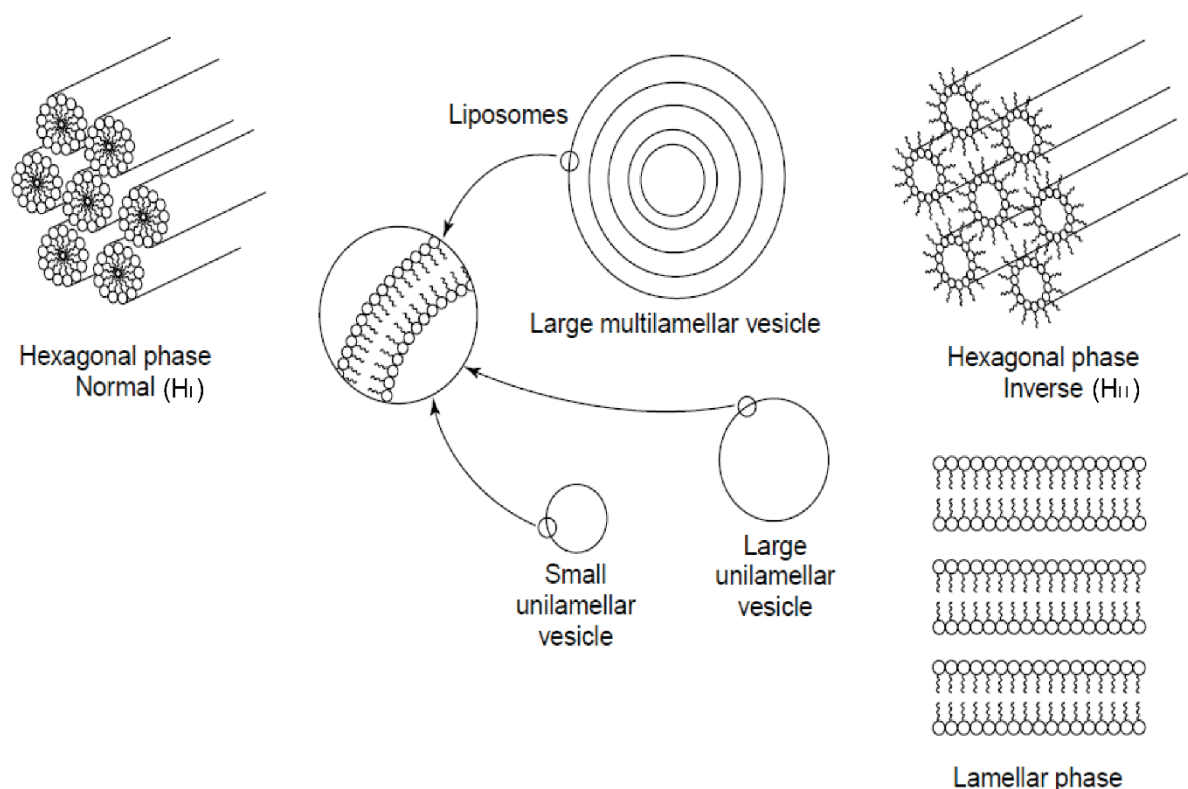


Figure 11 : Autoassemblage des lipides amphiphiles Représentation de structures lamellaire (L_α), hexagonale (H_I) et hexagonale inversée (H_{II}) de lipoplexes (adaptées de (Lasic, 1998)).

En 1987, le chercheur Philip Louis Felgner a émis l'hypothèse que les lipides cationiques pourraient améliorer l'encapsulation des acides nucléiques chargés négativement dans les systèmes de délivrance à base de lipides. En 1989, il a démontré avec ses collaborateurs l'efficacité de la transfection d'un ARNm transcrit *in vitro* codant pour la luciférase dans des cellules de souris NIH 3T3, en utilisant un liposome cationique (commercialisé sous le nom de lipofectin) composé d'un lipide cationique, le DOTMA (N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-triméthylammonium) et d'un phospholipide DOPE (1,2-diélaïdoyl phosphatidyl éthanolamine) (Malone et al., 1989). Les lipides cationiques ont permis d'optimiser l'encapsulation des acides nucléiques grâce à des interactions électrostatiques. De plus, la charge nette positive conférée aux lipoplexes (association de liposomes et d'acides nucléiques) facilite l'interaction et l'internalisation par les cellules *in vitro* (Hope et al., 1998). Cependant, la présence d'une charge positive permanente limite l'utilisation de ces vecteurs à des études *in vitro* en raison de leur forte toxicité et d'un manque d'efficacité *in vivo*. L'architecture lipidique de base relativement flexible, composée d'une tête hydrophile (head group) et d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe (hydrophobic tail) reliés par un fragment de liaison espaceur bifonctionnel (linker),

permet d'effectuer un large éventail de modifications chimiques différentes afin d'améliorer l'efficacité de transfection, réduire la cytotoxicité et améliorer la biocompatibilité, une partie de ces modifications ont été bien décrit dans la revue de l'équipe de Conn (S et al., 2024).

Pour pallier les limitations de la charge nette positive des lipides cationiques, Semple *et al.*, ont utilisé une autre approche de modification de la tête hydrophile de ces lipides. Dans leur étude, ils décrivent l'utilisation d'un aminolipide ionisable, le DODAP (1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane), pour l'encapsulation efficace d'oligonucléotides antisens. Ces complexes ont été appelés « stabilized antisense-lipid particles » (SALP), et sont composés du lipide ionisable DODAP, du phospholipide DSPC (Distearoylphosphatidylcholine), du cholestérol et du PEG-CerC14 (1-O-(2P-(w-methoxypolyethyleneglycol)succinoyl)-2-N-myristoylsphingosine) (Semple et al., 2001). Ces lipides ionisables sont conçus pour être neutres à pH physiologique, mais devenir chargés positivement à pH acides (inférieur à leur pKa) afin d'interagir avec les charges négatives des acides nucléiques et permettre ainsi l'encapsulation. Ces lipides cationiques ionisables seront abordés en détail par la suite dans ce chapitre.

En 2006, Zimmermann *et al.*, ont démontré que les petits ARN interférents (siRNAs), lorsqu'ils sont administrés par voie systémique sous forme de formulation liposomale contenant le lipide ionisable DLin-DMA (1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane), peuvent réduire l'expression de la cible pathologique, l'apolipoprotéine B (ApoB), chez les primates non humains. Les siRNAs spécifiques dirigés contre l'ApoB ont été encapsulés dans une version de SALP appelée « stabilized nucleic acid lipid particles » (SNALP) contenant les lipides DLin-DMA, DSPC, cholestérol et PEG-C-DMA (3-N-[(qmethoxypoly(ethylene glycol)2000)carbamoyl]-1,2-dimyristyloxy-propylamine) dans un rapport molaire de 40:10:48:2, respectivement (Zimmermann et al., 2006).

En 2010, des formulations telles que SALP et SNALP étaient considérées comme faisant partie de la famille des LNPs. Il a été rapporté que l'efficacité des formulations LNPs de siRNA pouvait être considérablement améliorée en optimisant le groupe hydrophile de tête du lipide ionisable. Le lipide ionisable identifié comme étant le meilleur dans l'étude menée par Semple *et al.*, en 2010 est le DLin-KC2-DMA, une version optimisée du DLin-DMA (figure 12) (Semple et al., 2010). Cette découverte a déclenché une campagne

intensive visant à identifier des lipides ionisables de plus en plus actifs. En 2012, le DLin-MC3-DMA (ester méthylique de l'acide 4 (N, N-diméthylamino) butyrique (dilinoyle)) connu sous le nom de MC3, a été identifié comme le meilleur lipide ionisable pour délivrer des siRNAs fonctionnellement actifs permettant de silencer le facteur VII (FVII), une glycoprotéine synthétisée par le foie. Dans la même étude, ils ont montré que le pKa apparent des lipides ionisables est un facteur déterminant de l'activité des LNPs et que les lipides les plus actifs présentent un pKa de 6,4 (Jayaraman et al., 2012).

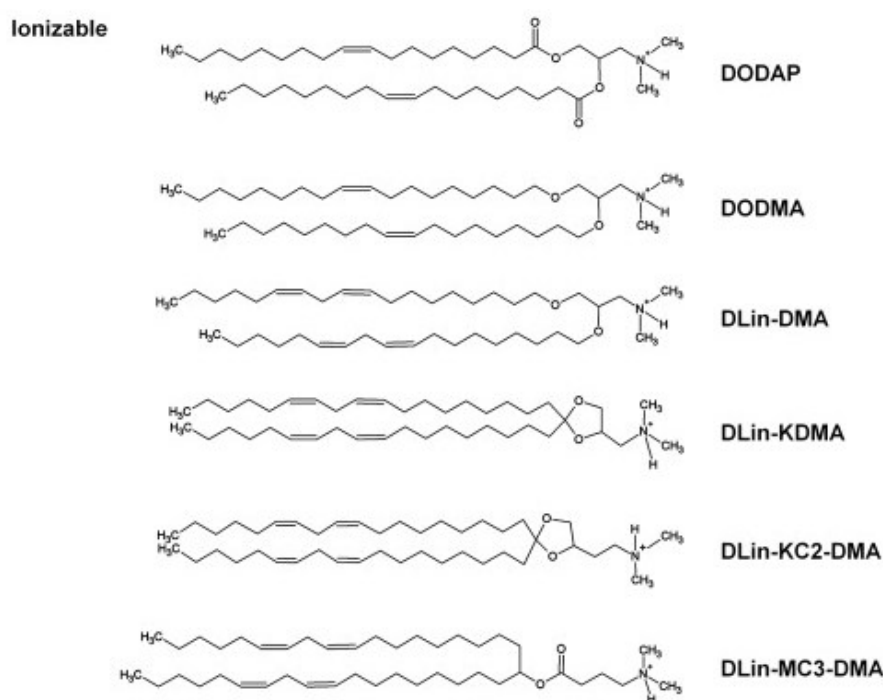


Figure 12 : Evolution de la structure des lipides ionisables (adaptée de (Leung et al., 2014)).

Entre 2012 et 2018, des complexes de siRNA-LNP contenant du lipide ionisable MC3 et du siRNA pour inhiber la transthyréline dans le foie ont réussi les différentes phases cliniques. Ce qui a conduit à l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) de l'Onpattro (patisiran) en 2018 pour le traitement de l'amylose à transthyréline héréditaire (ATTR), une maladie génétique rare liée à la production de transthyréline (TTR) défectueuse dans le foie (Adams et al., 2018). Ce médicament constitue un exemple typique d'application thérapeutique reposant sur l'utilisation de LNP contenant les lipides DLin-MC3-DMA (ionisable), DSPC (un

phospholipide auxiliaire), du cholestérol et un lipide PEGylé (DMG-PEG 2000) dans un rapport molaire de 50:10:38,5:1,5 respectivement.

En 2020, les vaccins à ARNm contre la COVID-19 (Comirnaty – Pfizer-BioNTech et Spikevax – Moderna) ont eu un impact révolutionnaire en sauvant la vie de millions de personnes. Depuis, un nombre croissant d'applications cliniques potentielles des thérapies à base d'ARNm font actuellement l'objet de développements en phase préclinique ou clinique (Y.-S. Wang et al., 2023). Les LNPs constituent aujourd'hui le système de délivrance d'acides nucléiques non viraux le plus avancé sur le plan clinique. Pour plus de détails, la revue, rédigée par deux chercheurs pionniers dans le domaine des systèmes de délivrance lipidique Dr Cullis et Dr Felgner, retrace l'évolution des LNPs pour la délivrance d'acides nucléiques (Cullis & Felgner, 2024).

2. Composition des LNPs

Toutes les formulations LNPs actuellement approuvées par la FDA et l'EMA (European Medicines Agency) contiennent quatre lipides. Les nombreuses propriétés structurales et biologiques des nanoparticules lipidiques ne sont pas attribuées à un seul composant lipidique, mais résultent plutôt de la combinaison de plusieurs lipides. Dans cette perspective, nous décrirons comment différents lipides favorisent le développement de caractéristiques clés des LNPs.

2.1. Lipides ionisables

La nature anionique de l'ARN nécessite l'utilisation de lipides chargés positivement (cationiques) capables d'interagir par des interactions électrostatiques afin d'assurer une encapsulation efficace dans les nanoparticules lipidiques par auto-assemblage. Ces lipides constituent généralement 30 à 50 % des lipides totaux dans une formulation LNP. De nombreuses recherches ont été consacrées à l'ajustement des propriétés des lipides ionisables afin d'améliorer encore leur efficacité, en particulier dans les tissus difficiles à atteindre. L'architecture globale des lipides cationiques et les lipides ionisables peut être divisée en trois parties fonctionnelles illustré dans la figure 13: (1) une tête hydrophile (headgroup), (2) un élément de liaison (linker) et (3) des queues hydrophobe (tails). Selon

le type de tête hydrophile, ces lipides peuvent être subdivisés en deux catégories : cationiques ou ionisables.

La tête hydrophile des lipides ionisables a généralement une charge protonable. Les dimensions et la densité de charge du headgroup sont responsables de l'encapsulation de l'acide nucléique, de la stabilisation du LNP, de l'interaction avec la membrane cellulaire et de la facilitation de l'échappement endosomal (endosome escape) (Ponti et al., 2021). Le linker relie généralement le groupe de tête hydrophile aux queues hydrophobe, bien que les linkers puissent être une partie des queues. Le linker a un impact sur la stabilité, la biodégradabilité, la cytotoxicité et l'efficacité de transfection des LNPs. Les linkers couramment utilisés dans la conception des lipides ionisables sont présentés dans la figure 13, b (Ponti et al., 2021).

Les queues hydrophobes ont un impact sur le pKa, la lipophilie, la fluidité et la fusogénicité, ce qui influence la formation et les performances des LNPs. En général, un lipide ionisable comprend une à quatre queues hydrophobes contenant entre 8 et 20 atomes de carbone. Ces queues peuvent être saturées ou insaturées (voir la figure 13, c).

Les lipides ionisables remplissent deux fonctions clés, notamment faciliter l'encapsulation de l'ARNm dans les LNPs et favoriser la rupture de la membrane endosomale afin de permettre la libération de l'ARNm dans le cytosol.

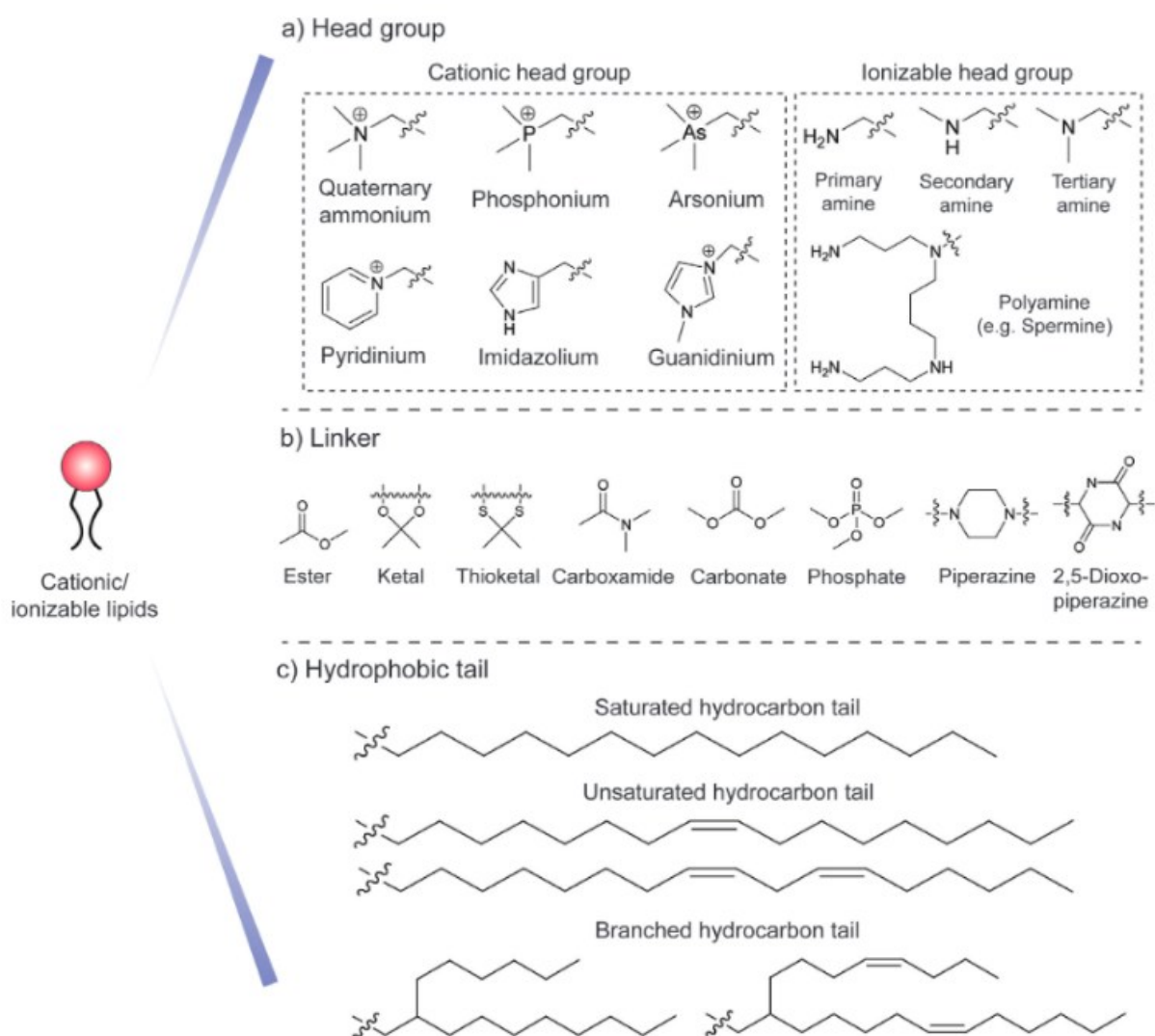


Figure 13 : Structures chimiques des lipides cationiques/ionisables classés en fonction de leurs trois composants fonctionnels : a) groupe de tête hydrophile, b) linker, et c) queue hydrophobe (Seo et al., 2023).

Il a été proposé que les lipides ionisables présentant une densité de charge du groupe polaire sensible au pH améliorent la biocompatibilité des lipides cationiques, voire l'efficacité de la délivrance de l'ARN. Pour présenter une charge positive de manière sélective en milieu acide, les lipides ionisables possèdent généralement des groupes polaires aminés dont le pKa apparent est proche ou inférieur à 6.4 (Tilstra et al., 2023). Ces groupes restent protonés dans un milieu acide ($\text{pH} < 7,4$), ce qui permet la complexation avec les acides nucléiques anioniques. Lors du mélange et de l'assemblage à pH acide ($\text{pH} \approx 4$), les lipides ionisables portent une charge positive et peuvent donc encapsuler les acides nucléiques anioniques. En revanche, ils restent presque neutres, avec une charge de surface légèrement cationique, dans des conditions physiologiques ($\text{pH} \approx 7,4$). Cette charge nette, dépendante du pH, confère aux LNPs à base de lipides

ionisables une biocompatibilité accrue, car elle empêche l'adhésion indésirable de composants sériques à la membrane lors de la circulation *in vivo*. Plus important encore, l'endocytose conduit à l'internalisation dans des compartiments intracellulaires, notamment les endosomes, caractérisée par un pH plus faible que celui du cytoplasme, ce qui provoque la protonation des lipides ionisables, entraînant la déstabilisation des particules et la libération de l'ARN.

2.2. Les phospholipides helpers

Les phospholipides ne représentent généralement que 10 à 20 % des lipides totaux dans une formulation LNP. Ils contribuent à l'encapsulation des acides nucléiques et à la stabilisation des LNPs. Ils sont utilisés comme lipides structuraux en raison de leur capacité à s'organiser spontanément en bicouches lipidiques et de leurs températures de transition de phase élevées, qui confèrent une grande stabilité aux membranes des LNPs.

Le DSPC est un lipide structurel composé d'un groupe de tête phosphatidylcholine (PC) et de deux queues saturées à 18 atomes de carbone, formant ainsi une bicouche lipidique étroitement empilée (phase lamellaire). Il a été utilisé dans les LNPs approuvées cliniquement, comme les thérapies à base de siRNA (Onpattro) en 2018, ou encore les vaccins à ARNm contre le SARS-CoV-2 en 2020.

Le DOPE est un autre phospholipide fréquemment utilisé dans les formulations LNPs. Le DOPE forme une couche lipidique plus fluide en raison de ses queues insaturées et sa capacité intrinsèque de s'organiser en phase hexagonale II (H_{II}). Cette phase H_{II} facilite la fusion de la membrane lipidique avec la membrane endosomale, ce qui entraîne la libération cytosolique d'acide nucléique. Récemment, Zhang *et al.*, ont rapporté que le DOPE entraînait une accumulation hépatique des LNPs C12-200, tandis que le DSPC entraînait une accumulation rénale après administration intraveineuse, suggérant ainsi l'influence de la structure lipidique sur la biodistribution des LNPs (R. Zhang et al., 2021).

2.3. Le stérol

Le cholestérol est un composant naturellement abondant des membranes cellulaires et l'un des lipides structuraux les plus utilisés dans les formulations LNPs avec un ratio molaire généralement de 20 à 50%. L'incorporation du cholestérol dans la formulation des LNPs permet d'augmenter la stabilité des nanoparticules en modulant la

rigidité des membranes. De plus, le cholestérol empêche les flux nets entrants/ sortants et préserve l'intégrité de la membrane.

Il est intéressant de noter qu'une étude menée par Patel *et al.*, a montré que le remplacement du cholestérol par des phytostérols naturels, comme le β -sitostérol, permettait d'améliorer considérablement la délivrance de l'ARNm par les LNPs. Cette amélioration serait due à un trafic lipidique différentiel dans la voie endocytaire et à une augmentation de l'échappement endosomal des LNPs (S. Patel et al., 2020a). Bien que le mécanisme par lequel les LNPs contenant du β -sitostérol sont plus susceptibles d'échapper à la voie endolysosomale reste inconnu, les auteurs suggèrent que ces LNPs, grâce à leur forme polymorphe et à leur organisation multilamellaire, peuvent déformer la membrane endosomale ou prolonger le délai de libération de l'acide nucléique (Eygeris et al., 2020; S. Patel et al., 2020a).

Le cholestérol se trouve principalement dans l'enveloppe externe du LNP, ce qui explique pourquoi la modification de la structure du stérol peut induire des changements dans l'organisation du LNP à la surface. De plus, une étude récente a suggéré que le cholestérol migre vers l'enveloppe lipidique externe à partir du noyau du LNP lorsqu'il est exposé à l'apolipoprotéine E (ApoE) (Sebastiani et al., 2021).

2.4. Les lipides PEGylés

Les lipides PEGylés (conjugué au polyéthylène glycol) constituent le pourcentage molaire le plus faible des composants lipidiques des LNPs (généralement 1,5 % en ratio molaire) et contribuent à l'auto-assemblage des LNPs. En effet, la barrière stérique hydrophile formée par les chaînes PEG à la surface des LNPs limite la fusion des nanoparticules entre elles durant leur formation, ce qui contribue à leur homogénéité. Le PEG fournit aux LNPs une couche externe stérique qui empêche l'agrégation des nanoparticules pendant le stockage et dans la circulation sanguine prolongeant ainsi la durée de circulation des nanoparticules *in vivo*. Lokugamage *et al.*, dans une étude d'optimisation de LNP pour la délivrance de l'ARNm thérapeutique nébulisé dans les poumons, ont démontré que les formulations totalement dépourvues de PEG-lipides produisaient des LNPs instables et polydisperses d'un diamètre supérieur à 200 nm (Lokugamage et al., 2021). D'autres études ont démontré que l'ajout d'au moins 0.5% en moles de lipides PEGylés permet l'obtention de LNPs stables, homogènes et d'une taille

moins de 80 nm (Hald Albertsen et al., 2022). La stabilité apportée par le PEG lors de la formulation est également durable dans le temps. Une autre utilisation potentielle des lipides PEGylés consiste à fonctionnaliser la surface des LNPs. Les lipides PEGylés fonctionnalisés permettent de bioconjuguer les LNPs à des ligands ou des biomacromolécules afin de cibler des cellules. Par exemple, Singh *et al.*, ont généré des LNPs encapsulant une combinaison de siRNA, de la polo-like kinase 1 (PLK1) et du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 3c (eIF3c) afin de cibler différentes voies cellulaires essentielles à la progression du cancer de l'ovaire. Ils ont utilisé du DSPE-PEG-amine pour conjuguer l'hyaluronane par une chimie NHS/EDC conventionnelle, dans le but de fonctionnaliser les LNPs pour cibler les cellules exprimant le cluster de différenciation 44 (CD44). Il est intéressant de noter que les LNPs recouvertes d'acide hyaluronique présentent une activité fonctionnelle prolongée et une cinétique de croissance des sphéroïdes réduite par rapport aux LNPs non recouvertes dans les tests *in vitro* (Singh et al., 2021). Bien que le PEG soit utile pour la stabilité et la bioconjugaison des LNPs, sa désorption est également essentielle pour la transfection cellulaire. Le taux de désorption du PEG peut être contrôlé en formulant des LNPs à partir de lipides PEGylés ayant différentes longueurs de chaîne acyle (Hald Albertsen et al., 2022).

Malgré les nombreux avantages de la formulation des LNPs, les lipides PEGylés ont néanmoins été associés à des phénomènes pseudoallergiques, pouvant entraîner des chocs anaphylactiques, par la génération d'anticorps anti-PEG (Vlatkovic, 2021).

Toutes ces propriétés sont en quelque sorte liées au rapport molaire du conjugué PEG-lipide ainsi qu'à la structure et à la longueur de la chaîne PEG et de la queue lipidique (Hald Albertsen et al., 2022).

3. Formulation des LNPs

La préparation des LNPs repose sur leur capacité d'auto-assemblage, c'est-à-dire l'organisation spontanée des composants lipidiques en entités nanostructurées par des interactions intermoléculaires. La formation des LNPs commence par l'association électrostatique entre les acides nucléiques chargés négativement et les lipides chargés positivement dans un tampon dont le pH est généralement de 4. Les LNPs se développent ensuite grâce aux interactions hydrophobes et de van der Waals entre les composants lipidiques. Le lipide PEGylé, l'un des composants lipidiques, empêche l'agrégation des

LNPs formées. En augmentant ensuite le pH à 7,4 par dialyse contre du PBS, le lipide cationique ionisable est converti en une forme neutre, ce qui confère aux LNPs une charge quasi neutre à des valeurs de pH physiologiques (figure 14) (Cullis & Felgner, 2024).

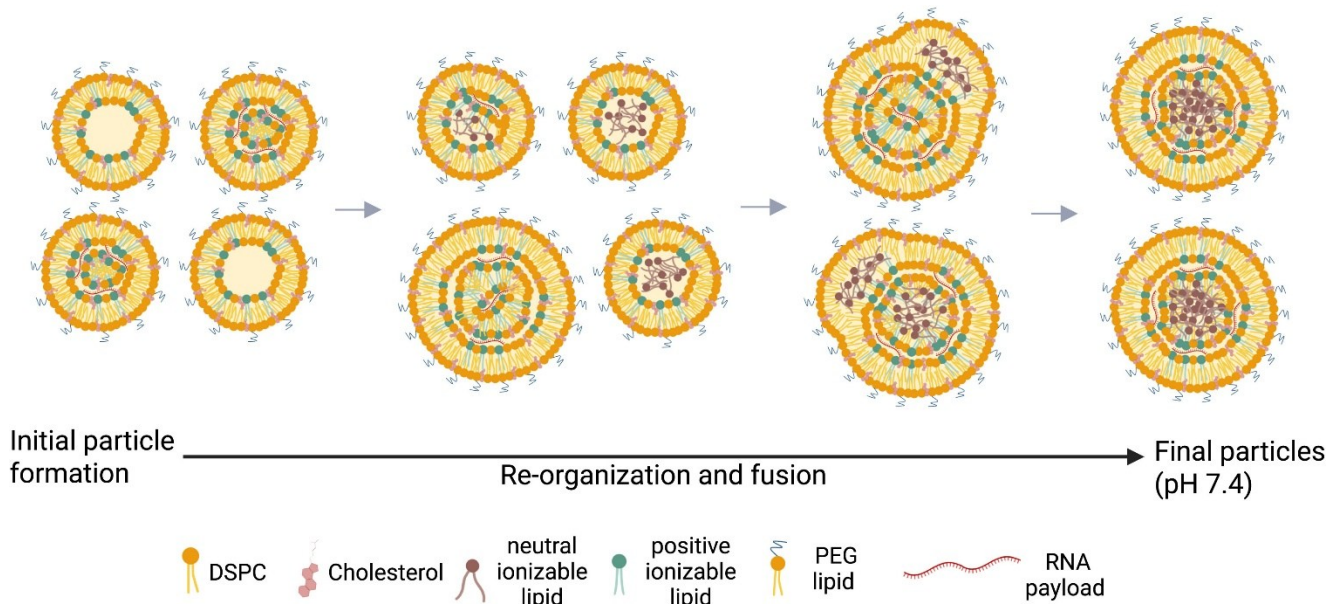


Figure 14 : Schéma de l'assemblage des complexes ARN-LNP, depuis le mélange à un pH de 4,0 jusqu'à la formation finale des particules à un pH physiologique de 7,4 (Brimacombe et al., 2025).

Dans le cadre d'expériences de recherche à petite échelle visant à améliorer l'administration d'ARN pour une application thérapeutique donnée, plusieurs paramètres de formulation des LNPs sont optimisés comme, la modification des structures chimiques des lipides, leur concentration finale, les modifications de séquence de l'ARN, la quantité d'ARN et le ratio lipide ionisable/acide nucléique (N/P : N pour azote et P pour phosphore). Cependant, une fois cette formulation LNP optimisée, il peut être difficile de la produire à grande échelle avec les mêmes caractéristiques pour des essais cliniques ou une production commerciale, par exemple, car les méthodes de production à petite et à grande échelle sont différentes. La production de LNP à petite échelle repose sur des techniques de mélange à la pipette ou par microfluidique, tandis que la production à grande échelle utilise le mélange en T (T-junction mixer), une méthode de mélange turbulent dans laquelle deux flux entrants entrent en collision dans un dispositif de mélange en forme de T. Cette technique a notamment été utilisée pour produire les LNPs du vaccin contre le SARS-CoV-2 (Shepherd et al., 2023).

La microfluidique est aujourd'hui privilégiée pour les études précliniques, car elle offre une bonne reproductibilité, permet un mélange rapide à l'échelle microscopique et

conduit à la formation de nanoparticules présentant une distribution granulométrique uniforme, avec une efficacité d'encapsulation élevée. De plus, les récentes avancées dans la fabrication de dispositifs microfluidiques ont rendu cette méthode plus accessible aux chercheurs (Eygeris et al., 2022).

4. Caractérisations et contrôles qualités des LNPs

Plusieurs paramètres doivent être vérifiés et validés avant l'utilisation des LNPs, que ce soit en recherche ou en clinique, notamment la taille, la morphologie, la polydispersité, l'efficacité d'encapsulation, etc. Certains tests sont utilisés en routine, tandis que d'autres sont réservés à des caractérisations approfondies, permettant par exemple d'établir une relation structure-activité (Halamoda-Kenzaoui et al., 2021).

Les LNPs, en tant que formulation finale, sont composées d'ARNm et de lipides ; il est donc essentiel d'évaluer l'identité et la pureté des composants individuels de cette formulation, car ces excipients peuvent avoir un impact direct sur les propriétés physico-chimiques, la stabilité et les performances biologiques de la formulation finale. La pureté des composants lipidiques peut être analysée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) associée à un détecteur à diffusion de lumière par évaporation (ELSD) ou détecteur d'aérosols chargés (CAD) (Nogueira et al., 2024). Pour l'ARNm, il est nécessaire de vérifier la taille et l'intégrité. La technique d'électrophorèse capillaire est largement utilisée en laboratoire, à petite échelle, et même à grande échelle sous une autre forme à haut débit, comme le Fragment analyzer d'Agilent. D'autres méthodes basées sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), telles que la chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC), la chromatographie liquide par exclusion stérique (SE-HPLC) ou la chromatographie liquide par échange d'ions (IEX-HPLC), ont également été utilisées avec succès pour analyser la pureté d'un grand nombre de molécules d'ARNm.

La taille :

La taille moyenne et la distribution granulométrique des LNPs sont des facteurs déterminants pour la qualité des LNPs et leur adéquation à diverses applications. Elles influencent leur comportement *in vivo*, affectant la bio-distribution, l'absorption cellulaire et l'activation du système immunitaire par les nanoparticules. En général, la taille optimale des LNPs est comprise entre 20 et 200 nm. Ces propriétés sont généralement

étudiées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La spectroscopie de diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules en analysant leurs mouvements browniens caractérisés par la diffusion de la lumière. Les particules de petite taille diffusent la lumière plus rapidement, tandis que les particules de plus grande taille présentent une diffusion plus lente. La DLS mesure le coefficient de diffusion (D), qui est ensuite utilisé pour calculer le diamètre hydrodynamique (d_H) à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein ci-dessous :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

D_h : Diamètre hydrodynamique

D_t : Coefficient de diffusion translationnelle (nous le définissons par diffusion dynamique de la lumière)

η : Viscosité du solvant **k_B** : Constante de Boltzmann **T** : Température

La DLS est souvent utilisée pour caractériser rapidement et systématiquement la distribution granulométrique lors d'études de criblage et de stabilité de divers types de vecteurs de délivrance de médicaments à l'échelle nanométrique. Cette technique présente plusieurs avantages : une faible quantité d'échantillon nécessaire, un temps d'acquisition et d'analyse réduit, ainsi qu'une compatibilité avec une grande variété de compositions de solvants.

La structure :

La structure et la morphologie des LNPs ont été décrites comme ayant un effet significatif sur leur temps de circulation, la libération de l'ARNm et leurs interactions avec les membranes cellulaires. Des efforts ont été déployés pour comprendre l'impact du choix des lipides, de la composition et de la méthode de formulation sur la formation de la structure des nanoparticules (Eygeris et al., 2022). La structure des nanoparticules a été étudiée à l'aide de la diffusion neutronique à petit angle (SANS : small-angle neutron scattering), de la diffusion des rayons X à petit angle (SAXS : small-angle x-ray scattering), de la microscopie électronique en transmission (cryo-TEM), de la microscopie à fluorescence et de la résonance magnétique nucléaire (RMN). L'utilisation de ces

techniques pour l'étude de la structure et la morphologie des vecteurs lipidiques ont été abordés en détails dans la revue (Nogueira et al., 2024).

Potentiel zêta :

La charge superficielle des LNPs est responsable des interactions avec les membranes cellulaires et l'environnement biologique. La charge superficielle des LNPs est généralement évaluée par des mesures du potentiel zêta. Cette technique est généralement utilisée pour évaluer l'agrégation colloïdale, et bien qu'il n'existe pas de classification stricte, la charge superficielle est considérée comme faible si le potentiel zêta se situe entre -20 et +20 mV. Parmi les différentes méthodes pour la détermination du potentiel zêta, la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS) et la diffusion de la lumière par analyse de phase (PALS) sont les approches les plus courantes (Nogueira et al., 2024).

Nous avons évoqué quelques paramètres critiques des LNPs à vérifier, mais il en existe d'autres qui n'ont pas été abordés dans cette partie, notamment le pKa apparent des LNPs, l'hydrophobicité de la surface des LNPs et la stabilité au stockage.

5. Optimisation des LNPs

Outre l'optimisation de la séquence d'ARNm et de sa production, l'optimisation des LNPs présente également un grand potentiel pour améliorer considérablement la sécurité, la stabilité et l'efficacité des thérapies à base d'ARNm. Différents paramètres peuvent être optimisés. Comme le montre la figure 15, les LNPs conventionnelles se composent de quatre éléments : des lipides cationiques/ionisables, des phospholipides auxiliaires, du cholestérol et des lipides PEGylés.

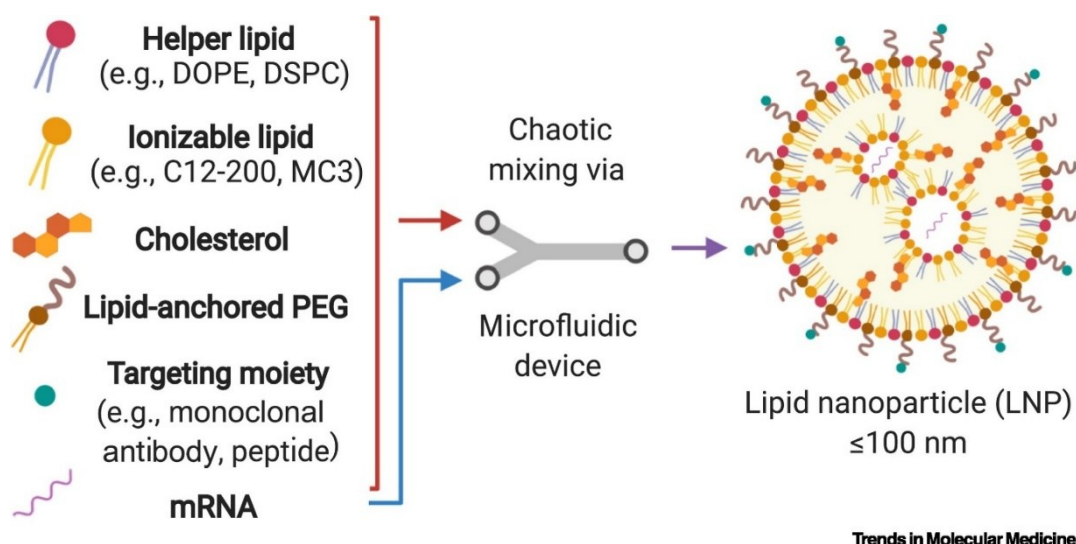


Figure 15 : Composants typiques et préparation des LNPs (Swingle et al., 2021).

La propriété de ciblage des LNPs est essentielle pour traiter diverses maladies. Elle améliore l'efficacité des formulations ARNm-LNP et prévient leur toxicité systémique. Dans des études récentes, les stratégies de ciblage des LNPs comprennent l'analyse de la relation structure-activité, la modification des ligands à la surface ou encore la stratégie de ciblage sélectif des organes (SORT : selective organ targeting). La conception rationnelle des LNPs pour l'administration d'ARNm aux tissus extra hépatiques reste un défi majeur à relever pour exploiter pleinement le potentiel de la technologie ARNm-LNP dans le traitement de différentes maladies. En effet, les propriétés physiques et chimiques des LNPs conventionnelles sont similaires à celles des lipoprotéines de très basse densité présentes dans le sang (VLDL : Very low-density lipoproteins), ce qui les rend susceptibles d'adsorber l'apolipoprotéine E (ApoE), puis d'être endocytées via le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR : Low-density lipoprotein receptor), entraînant une accumulation des LNPs dans le foie. La stratégie SORT a constitué une nouvelle « ligne directrice » pour la conception de LNPs ciblant différents organes. Il a été démontré que l'ajout d'un cinquième composant (SORT component, molécule d'adressage) aux LNPs conventionnelles à quatre composants permettait de cibler un organe spécifique *in vivo*, ce qui conduisait à une administration extra-hépatique de l'ARNm (Dilliard et al., 2021). Plus précisément, elles peuvent moduler la biodistribution des LNPs, le pKa apparent et le type de protéines sériques adsorbées à la surface des LNPs, ce qui a un impact significatif sur la capacité de ciblage des LNPs *in vivo* (Dilliard et al., 2021).

L'autre défi majeur des systèmes de délivrance lipidique, notamment des LNPs, est l'efficacité de l'échappement endosomal. Il existe trois types de voies d'absorption cellulaire des LNPs : la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose assistée par récepteur. Une fois absorbées, les LNPs sont piégées dans des endosomes et passent par plusieurs compartiments endocytaires : les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Les endosomes sont de petites vésicules qui se forment par endocytose à partir de la membrane cellulaire, notamment les endosomes précoces et tardifs. L'échappement endosomal se produit généralement au cours de la période des endosomes précoces, lorsque les LNPs transportent l'ARNm vers les cellules cibles par endocytose. L'environnement légèrement acide des endosomes (pH d'environ 6,3 pour les endosomes précoces, d'environ 5,5 pour les endosomes tardifs et d'environ 4,7 pour les lysosomes) provoque la protonation des lipides ionisables et leur fusion avec la membrane endosomale chargée négativement, ce qui facilite la libération de l'ARNm des LNPs dans le cytoplasme pour sa traduction en protéines (Liu et al., 2021). L'échappement endosomal peut être amélioré en optimisant la valeur de pKa apparent des LNPs (P. Patel et al., 2021). Le choix des phospholipides (par exemple, le DSPC et le DOPE) et leurs proportions peuvent également améliorer l'échappement endosomal. Kauffman et al., ont par exemple amélioré l'échappement endosomal de l'ARNm de l'érythropoïétine en modifiant la proportion et la structure des lipides, ce qui a permis de multiplier par sept la transfection de l'ARNm (Kauffman et al., 2015).

L'application rapide et évolutive des vaccins à ARNm dépend fortement de leur stabilité durant le stockage et des contraintes logistiques. Plusieurs études ont été menées et d'autres sont en cours pour améliorer la stabilité des complexes ARNm-LNP et rendre cette technologie accessible à tous, notamment dans les pays où il est difficile d'assurer une chaîne du froid à -80 °C (S. Wang et al., 2024).

D'autres axes, non abordés ici, peuvent être optimisés pour améliorer la délivrance d'ARN avec les LNPs, comme la réduction de l'immunogénicité des LNPs due au lipide PEG et aux autres lipides. En effet, le lipide cationique/ionisable avec son groupe amine est reconnu par les TLR2 et TLR4 situés à la surface des macrophages et d'autres cellules, ce qui stimule l'immunogénicité (Chaudhary et al., 2024; Vlatkovic, 2021).

Résultats : premier article

Impact des lipides auxiliaires sur l'efficacité et le trafic intracellulaire des LNPs

L'approbation des vaccins Comirnaty® de Pfizer/BioNTech et Spikevax® de Moderna contre le SARS-CoV-2 illustre l'efficacité des LNPs en tant que vecteurs lipidiques pour la délivrance d'ARNm.

Néanmoins, ces systèmes de délivrance, comme évoqué dans le chapitre 2, présentent des limites, notamment en ce qui concerne l'efficacité de l'échappement endosomal. Plusieurs études ont démontré que le taux d'ARN délivré dans le cytosol lors de la transfection des cellules par les LNPs était faible (1 à 2.5 %) (Gilleron et al., 2013).

Des études ont démontré que les lipides auxiliaires (phospholipides et stérols) influent sur la structure, la stabilité et le trafic intracellulaire des LNPs modulant ainsi leur efficacité dans la délivrance de l'ARNm (S. Wang et al., 2024). Les phospholipides auxiliaires, comme le DOPE et le DSPC sont connus pour contribuer à la stabilité et à l'efficacité des formulations. Le DSPC est un phospholipide qui prend une forme cylindrique, ce qui confère une grande stabilité aux formulations LNPs (Barbieri et al., 2024), tandis que le DOPE possède des propriétés fusogènes induisant de meilleures efficacités de transfection au dépend d'une moindre stabilité (R. Zhang et al., 2021). Parmi les différentes études menées sur les stérols dans la formulation de LNP, le groupe Sahay a révélé que les LNPs préparées avec du β -sitostérol, un analogue naturel du cholestérol, étaient plus efficaces. L'inclusion de β -sitostérol à la place du cholestérol a amélioré la transfection de l'ARNm. Cette amélioration serait due aux différences dans la microstructure des LNPs et dans le trafic intracellulaire (S. Patel et al., 2020b).

Notre objectif était d'étudier l'impact des lipides auxiliaires sur le trafic intracellulaire des LNPs et d'identifier une formulation offrant une efficacité de délivrance élevée. Pour ce faire, nous avons comparé différentes formulations de LNP contenant des lipides auxiliaires différents pour la délivrance d'ARNm, *in vitro* et *in vivo*. Les trois formulations comparées sont des LNPs contenant du DSPC et du cholestérol (la référence), du DOPE et du cholestérol, ou du DOPE et du β -sitostérol.



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 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.

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 ($\text{pH} \leq 4.0$) [11]. Lipids include an ionizable lipid ($\text{pK}_a < 7$) 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 ($\text{pH} 6.3$) to late endosomes ($\text{pH} 5.5$) and finally lysosomes ($\text{pH} < 5$) [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 DPSC 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 (FORTESSA X20; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30\text{ nm}$. 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.

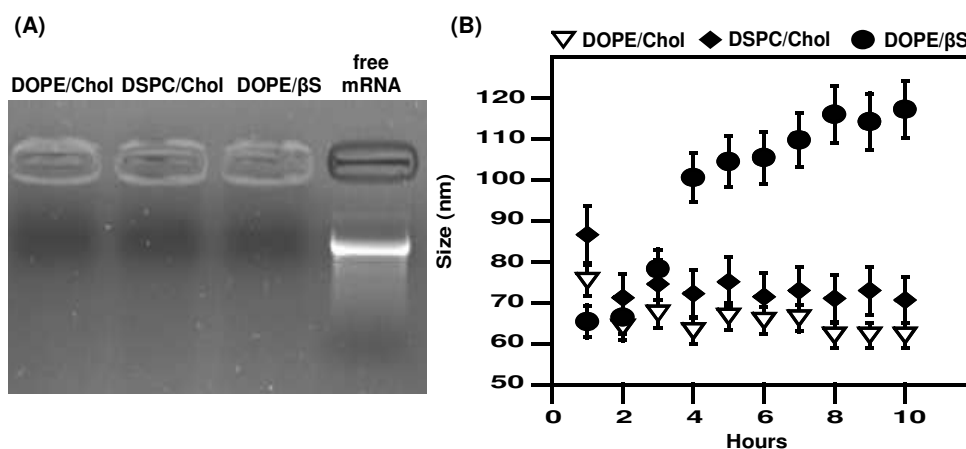


Figure 1. mRNA complexation and stability of mRNA LNPs in serum-containing media. (A), mRNA complexation: Free or LNP-complexed mRNA were run on an agarose gel electrophoresis; (B), Size stability: LNPs were incubated in media containing bovine serum at 37 °C and size was monitored by DLS. DLS measurements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

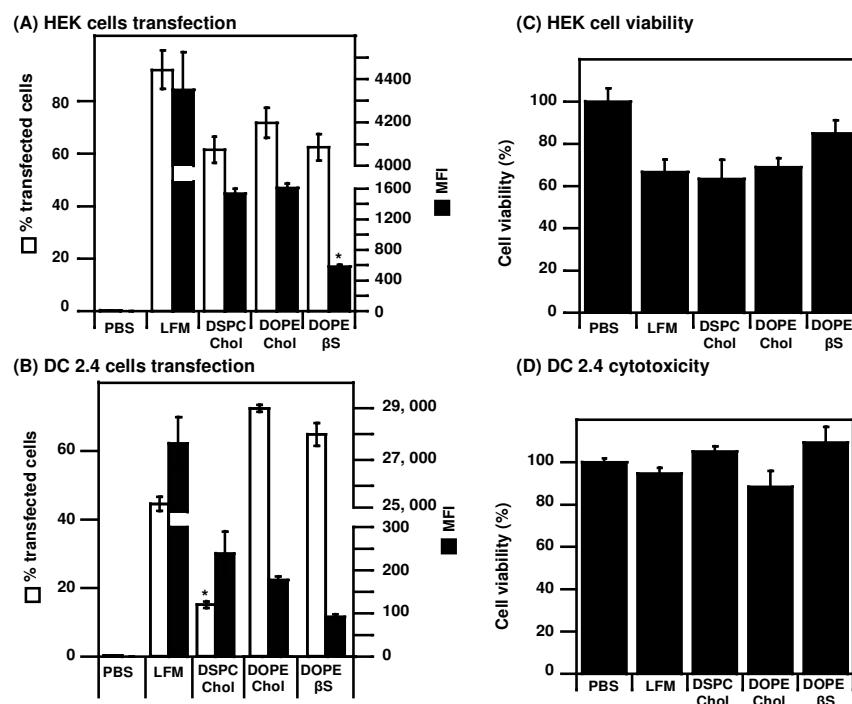


Figure 2. Evaluation of mRNA LNPs transfection efficiency: LNPs prepared with EGFP mRNA were used to transfect HEK cells (A,C) or DC 2.4 cells (B,D). Transfection efficiency and cytotoxicity were measured 24 h after transfection. Data are presented as mean $\pm$ SD of two experiments performed in triplicates,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

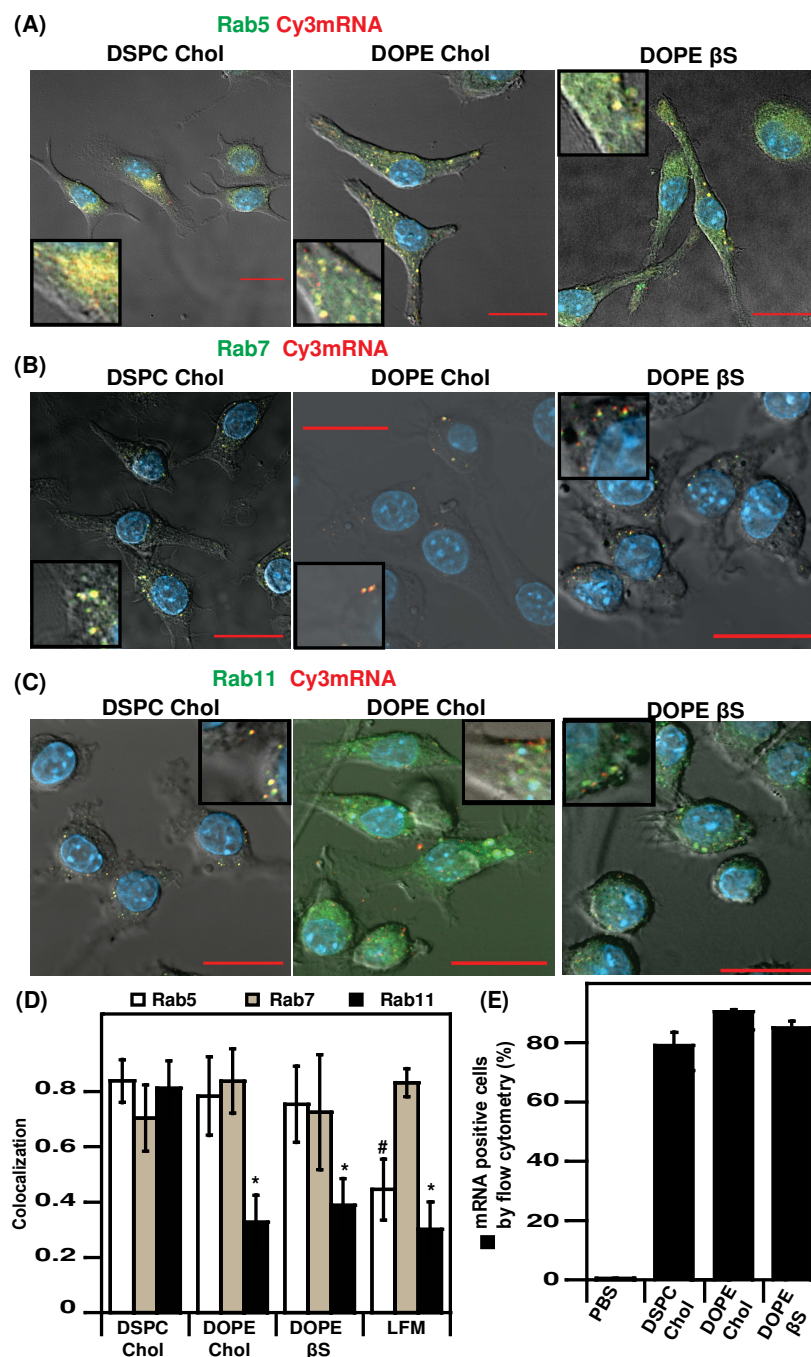


Figure 3. Intracellular trafficking of Cy3 mRNA-LNPs in DC 2.4 cells by confocal microscopy and flow cytometry: (A), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (B), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (C), Rab5-GFP colocalization with Cy3 mRNA; (D), Pearson's colocalization coefficient quantification; (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.

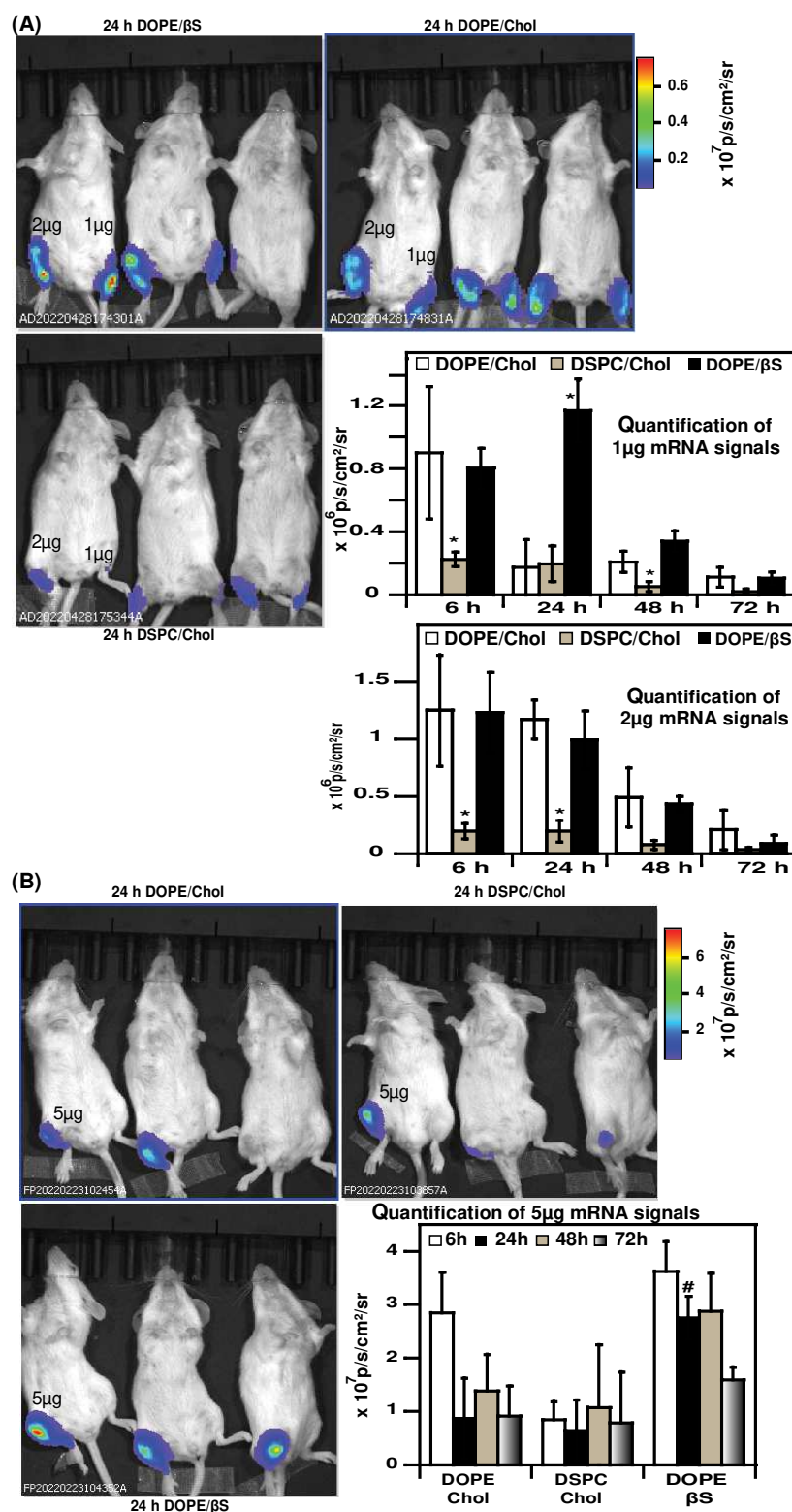


Figure 4. Evaluation of mRNA LNPs in vivo expression: (A), representative images of luciferase expression 24 h after intramuscular injection of 1 μ g or 2 μ g mRNA-LNPs, signal was during 3 days ($n = 3$); (B), representative images of luciferase expression 24 h after intramuscular injection of 5 μ g 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-Daspi, 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.; Welsher, 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.

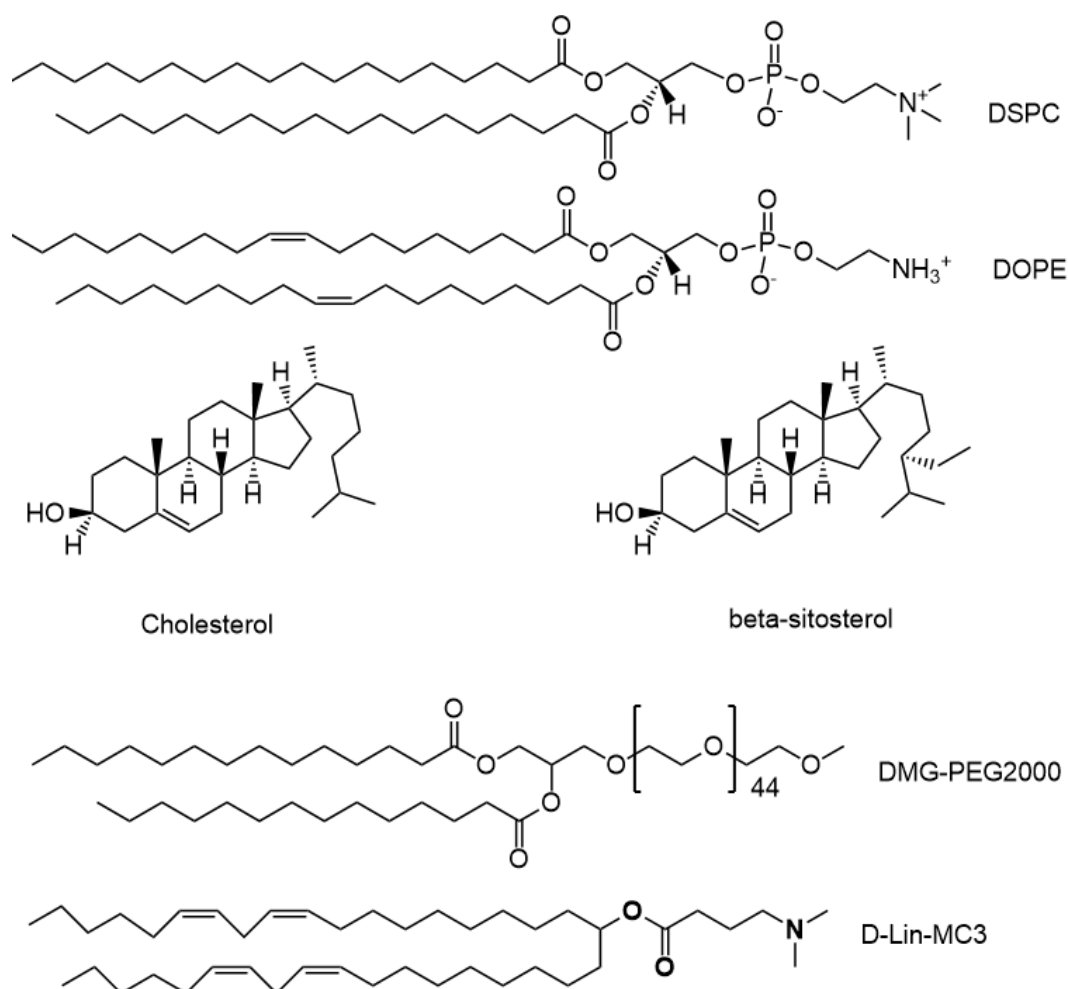
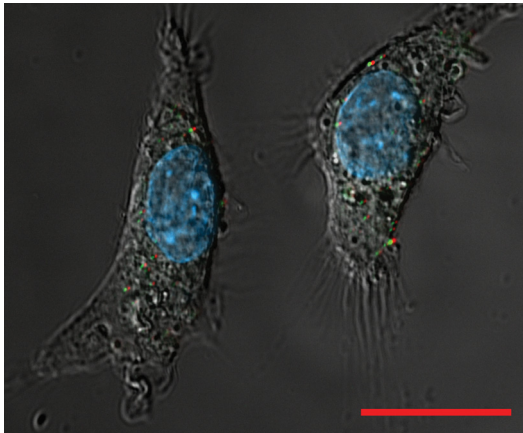


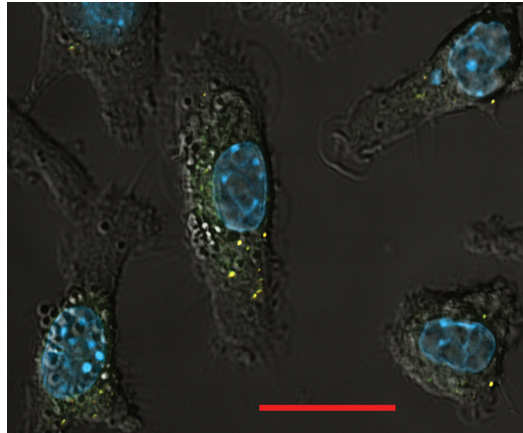
Figure S1. Structures of the lipids used in this study.

LFM / Cy3mRNA

Rab5



Rab7



Rab11

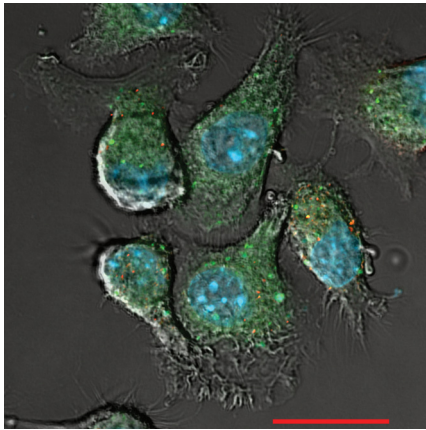


Figure S2. Intracellular trafficking of Cy3 mRNA-LFM complexes in DC 2.4 cells by confocal microscopy with either Rab5-GFP, Rab7-GFP or Rab11-GFP. Nuclei were stained with DAPI. Bar represents 20 μ m.

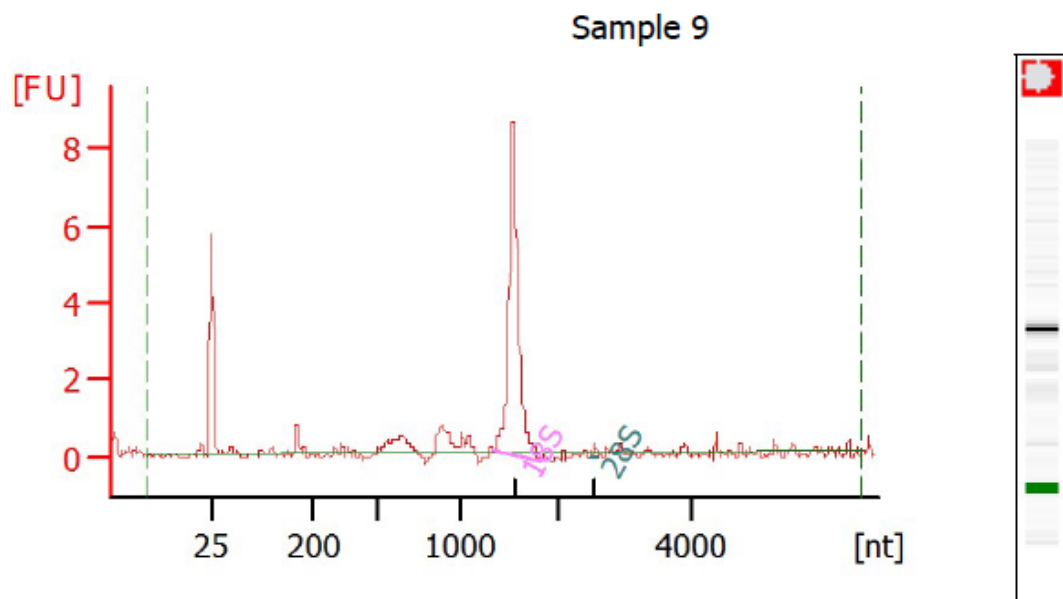


Figure S3. Agilent analysis of the GFP mRNA produced by *in vitro* transcription.

Résultats : deuxième article

Évaluation de l'ARNm synthétique avec des séquences UTR sélectionnées et une queue poly(A) alternative

Les vaccins à ARN messager (ARNm) ont démontré une efficacité remarquable dans la prévention de la COVID-19. Cette efficacité est due à la fois aux systèmes de délivrance utilisés et à l'optimisation des séquences d'ARNm. L'ARNm synthétique possède la même structure primaire que l'ARNm mature, composée de cinq éléments organisés de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' : une coiffe en 5', une région non traduite en 5' (5' UTR), une séquence codante, une région non traduite en 3' (3' UTR) et une queue poly(A). Chacun de ces éléments joue un rôle essentiel dans la stabilité et l'efficacité de la traduction de l'ARNm.

Les deux vaccins à ARNm actuellement approuvés contre le SARS-CoV-2, le mRNA-1273 de Moderna et le BNT162b2 de Pfizer/BioNTech, illustrent l'importance de cette optimisation. Les différences dans la conception de leurs séquences, notamment au niveau des régions non traduites (5'UTR et 3'UTR), ainsi que dans l'optimisation des codons, pourraient expliquer en partie pourquoi le vaccin de Moderna nécessite une dose plus élevée (100 µg par injection) que celui de Pfizer/BioNTech (30 µg par injection) pour induire une réponse immunitaire comparable (Xia, 2021). Un autre élément clé de la traduction et de la stabilité de l'ARNm est la queue poly(A). Généralement, une queue de 120 adénosines est utilisée dans les ARNm synthétiques. BioNTech a développé une queue poly(A) de 30 et 70 adénosines séparées par un linker de 10 nucléotides (GCAUAUGACU) qui prolonge la demi-vie de l'ARNm et améliore l'efficacité de la traduction plus efficacement que la méthode des queues poly(A) à longue chaîne (Fang et al., 2022). En revanche, la queue de l'ARNm-1273 contient environ 100 adénosines et un pentamère terminal UCUAG, qui correspond très probablement au reste du site de restriction après la linéarisation de la matrice d'ADN (Gumińska et al., 2025).

Dans notre étude, nous avons cherché à améliorer l'efficacité de l'ARNm synthétique en testant une sélection de séquences UTR et une queue poly(A) alternative. Nous avons

utilisé comme références les UTRs et la queue poly(A) de l'ARNm du vaccin contre la COVID-19 de BioNTech.

6. Les constructions plasmidiques

Nous allons décrire dans cette partie la démarche utilisée pour la génération de notre banque de plasmide utilisée dans cette étude. Seul un exemple sera détaillé mais la même procédure a été utilisée pour toutes mes constructions plasmidiques.

Les séquences 5' UTR, 3' UTR, la séquence de la protéine Spike, et 3 plasmides : pT7 – 5'UTR hAg – NanoLuc – 3'UTR AES-mtRNR1 – Poly(A), la queue poly(A) s'agit soit du A30-L-70 utilisée dans la séquence d'ARNm du vaccin de Pfizer-BioNTech, soit du A120, soit A/G120 ont été commandées chez Genscript (<https://www.genscript.com/>).

Le plasmide pF4Ag de référence (pT7 – 5'UTR hAg – NanoLuc – 3'UTR AES-mtRNR1 – Poly(A)) a été conçu de manière à rendre le changement de différents éléments de l'ARNm faciles en ajoutant des sites de restrictions (Figure 16), et il a servi à la génération des différentes constructions par clonage classique dans le plasmide pF4AG.

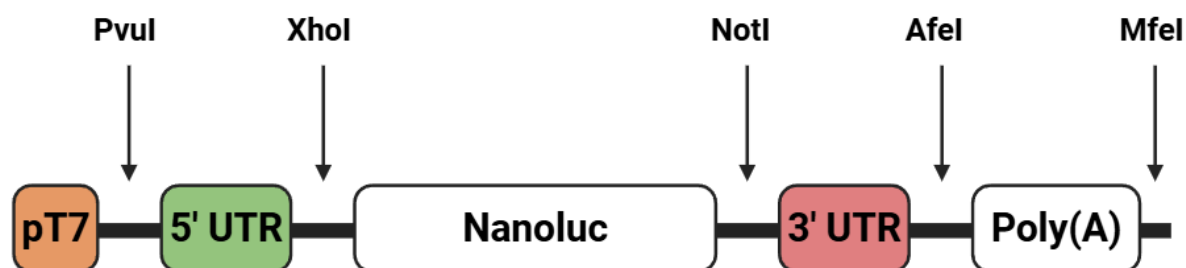


Figure 16: Schéma de la conception des différents éléments de l'ARNm pour la stratégie de clonage par site de restriction (créé sur Biorender)

Nous prenons l'exemple de la construction de plasmides avec la NeoUTR3 en 5'UTR et trois 3'UTR différentes (AES-mtRNR1, VP6 Rota et MnSOD). Dans ce cas de figure, le plasmide vecteur contenant la 5'UTR neoUTR3 a été digéré par XhoI et AfeI afin de retirer la partie codante et le 3'UTR. Trois vecteurs différents contenant le gène rapporteur nanoluc et les trois 3'UTR ont été digérés par les mêmes enzymes. La séparation des bandes a été effectuée sur un gel d'agarose, puis les bandes ont été purifiées à l'aide du kit Gel & PCR Cleanup (Macherey Nagel). Le vecteur a été déphosphorylé par la phosphatase alcaline (NEB). Une ligation avec un ratio de 1 :10 (vecteur : insert) a ensuite été réalisée avec la T4 DNA ligase. Les différents plasmides ont ensuite été utilisés pour la

transformation afin de les amplifier. Après chaque transformation, la PCR sur colonies a été systématiquement réalisée avec une amorce sur l'insert et l'autre sur le vecteur. Dans la figure 17, quatre colonies par construction ont été testées, et l'on peut observer les bandes attendues 818 pb et 599 pb dans le cas des constructions neoUTR3-NL-AES et neoUTR3-NL-Rota, respectivement. Pour la troisième construction neoUTR3-NL-SOD, d'autres clones ont été sélectionnés (données non présentées). Après avoir sélectionné les clones pour chaque construction, une midiprep ou une maxiprep est réalisée à l'aide de kits (Machery Nagel), puis les plasmides sont séquencés (Eurofins). Des stocks glycérolés de bactéries sont également préparés.

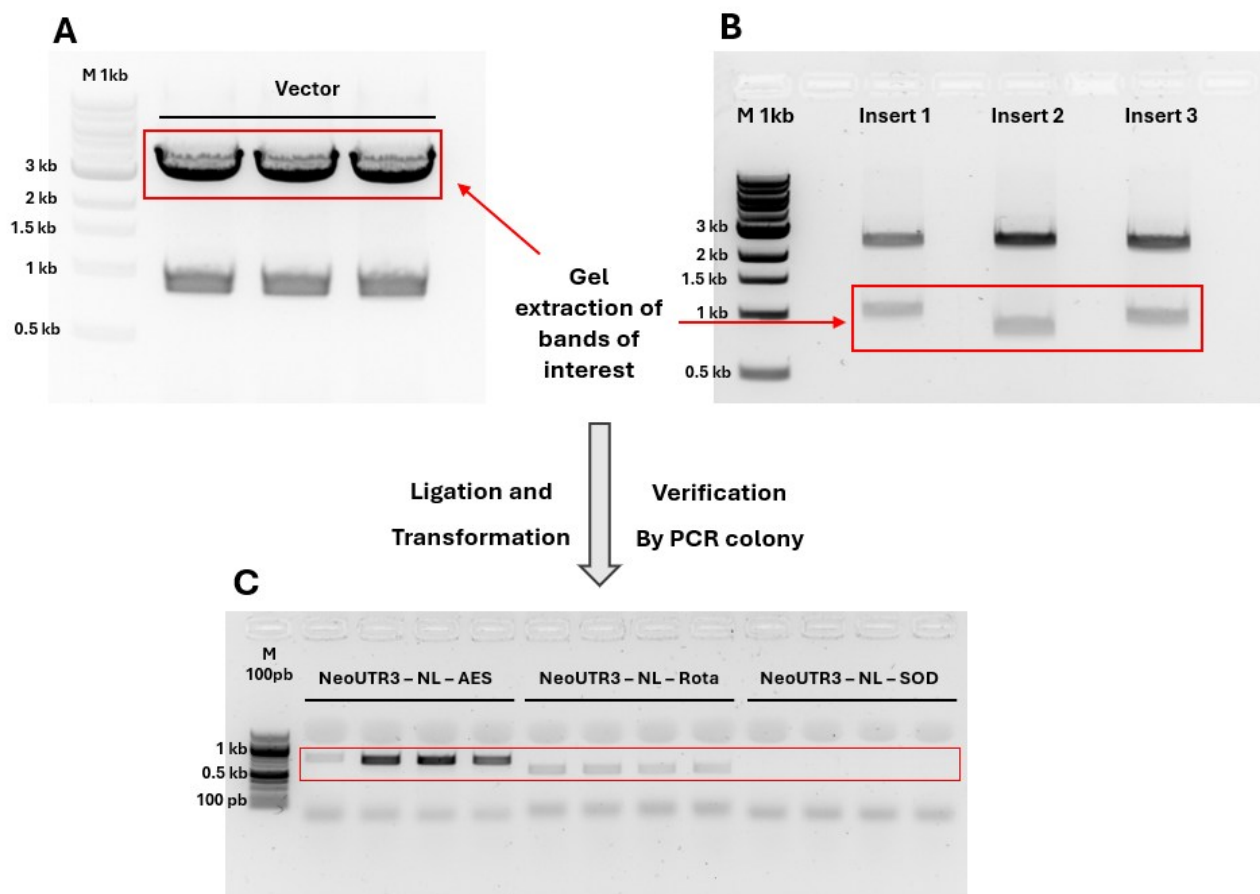


Figure 17 : Gel d'agarose du clonage des plasmides avec la 5'UTR NeoUTR3 et les différentes 3'UTRs : A) gel d'agarose du vecteur pF4Ag digéré par XhoI et AfeI ; B) gel d'agarose des inserts (les différentes 3'UTRs) ; C) gel d'agarose des PCR sur colonies des 3 constructions générées.

Evaluation of synthetic mRNA with selected UTR sequences and alternative poly(A) tail, *in vitro* and *in vivo*

Ayoub Medjmedj,¹ Hugo Genon,¹ Dounia Hezili,¹ Albert Ngalle Loth,¹ Rudy Clemençon,¹ Cyril Guimpied,¹ Lucile Mollet,¹ Anne Bigot,² Frank Wien,³ Josef Hamacek,¹ Clément Chapat,⁴ and Federico Perche¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR4301, 45071 Orléans, France; ²MyoLine, Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, 75013 Paris, France; ³Synchrotron SOLEIL L'Orme des Merisiers, Saint-Aubin - BP 48, 91192 GIF-sur-YVETTE Cedex, France; ⁴Centre for Integrative Biology (CBI), Molecular, Cellular and Developmental Biology (MCD), CNRS/Université de Toulouse 118 Route de Narbonne, bâtiment IBCG, 31062 Toulouse Cedex 09, France

Messenger RNA (mRNA) has emerged as an attractive new technology of drugs. The efficacy of mRNA technology depends on both the efficiency of mRNA delivery and translation. Untranslated regions (UTRs) and the poly(A) tail play a crucial role in regulating mRNA intracellular kinetics. Intending to improve the therapeutic potential of synthetic mRNA, we evaluated various UTRs and tail designs, using Pfizer-BioNTech coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine sequences as a reference. First, we screened six 5' UTRs (cap-dependent/-independent), evaluated nine 5' UTR-3' UTR combinations, and a novel heterologous A/G tail in cell models, and *in vivo* using luciferase as a reporter gene. Then, to decipher the translation mechanism of selected UTRs, we correlated mRNA expression with ribosome load, mRNA half-life, mRNA immunogenicity, and UTR structures. Our results showed that the heterologous tail we introduced is as potent as the Pfizer-BioNTech tail and confirmed the high potency of the human α -globin 5' UTR. They also revealed the potential of the VP6 and SOD 3' UTRs. We validated our results using mRNA encoding the SARS-CoV-2 spike protein formulated as lipid nanoparticles (LNPs) for mouse immunization. Overall, the selected 3' UTRs and heterologous A/G tail have great potential as new elements for therapeutic mRNA design.

INTRODUCTION

The extraordinary success of mRNA vaccines against coronavirus disease 2019 (COVID-19) has shown the potential of mRNA for a wide range of applications.^{1,2} Synthetic mRNA has the same primary structure as mature mRNA molecules, typically consisting of five elements (from 5' to 3'): a cap structure, a 5' untranslated region (5' UTR), a coding sequence, a 3' UTR, and the poly(A) tail. The production of synthetic mRNA by *in vitro* transcription (IVT) is simple, fast, and cost-effective at any scale. The starting point for IVT mRNA production is the DNA template, which can be a PCR product or linearized plasmid DNA, typically carrying a phage promoter (i.e., T7) and domains of the mRNA: 5' UTR, ORF, 3' UTR, and particu-

larly the poly(A) tail. Several parameters can significantly affect the quality of IVT mRNA, including DNA template quality, reaction components, capping strategy, and downstream purification methods (reviewed by Lenk et al.).³ The structural elements of mRNA modulate mRNA stability, translation efficiency, and overall performance. These domains are finely optimized to enhance the potency of the synthetic mRNA (reviewed by Kang et al.).⁴ In the present study, we focused on UTR and poly(A) domain optimizations.

The translation initiation efficiency of mRNA is affected by the sequence and structure of the 5' UTR region.⁵ While UTRs are not translated, they contain regulatory elements that control mRNA half-life, intracellular localization, and translation rate by interacting with translation factors, mRNA-binding proteins, and microRNAs (miRNAs).^{6,7} A significant amount of research explored the optimization of 5' and 3' UTRs using different technologies to identify sequences that can improve the translatability of mRNA.^{8–12} For example, the 5' and 3' UTRs of the mRNA encoding the SARS-CoV-2 Spike protein in Moderna and Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccines are different in their sequence and structure. In the Moderna mRNA vaccine, they used a 5' UTR of undisclosed origin along with the 3' UTR from human α -globin, while the Pfizer-BioNTech mRNA vaccine contains the 5' UTR of human α -globin, which was identified as one of the top 20% 5' UTRs in massive screening studies,^{10,11,13} and the 3' UTR AES-mtRNR1 combination of two genes, AES (Amino Enhancer of Split) and mtRNR1 (12S mitochondrial RNA).¹² An additional class of mRNA 5' UTR consists in the Internal Ribosome Entry Sites (IRES), which can initiate translation in a cap-independent manner. IRES are complex RNA structures found in some viral (e.g., EMCV) and cellular mRNAs (e.g., VCIP).¹⁴ However, predicting the optimal combination of 5' and

Received 12 March 2025; accepted 25 July 2025;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102648>.

Correspondence: Federico Perche, Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR4301, 45071 Orléans, France.

E-mail: federico.perche@cnrs.fr



3' UTR remains challenging due to tissue and cell-type dependencies, and RNA folding of UTRs, which can be affected by the coding sequence.

Another key element in mRNA translation and stability is the poly(A) tail. It protects the mRNA from degradation¹⁵ and is required to form a closed loop between the 5' and 3' ends of the mRNA, a conformation that stimulates translation.¹⁶ However, the presence of the poly(A) tail on the plasmid template for mRNA production is not stable and prone to shortening in bacteria during plasmid DNA amplification.¹⁷ BioNTech demonstrated that poly(A) stretches of 30 and 70 adenosines separated by a 10 nt linker (A30L70 tail) resulted in more stable poly(A) tails on plasmid templates.¹⁸ Other poly(A) tails have been developed by researchers using different strategies.^{17–20}

In this study, we aimed to enhance the translatability of synthetic mRNA and establish informed structure-activity relationships of mRNA containing a selection of UTR sequences and poly(A) tails. To achieve this, we first introduced another solution to overcome the instability of poly(A) tails on plasmid templates by using a novel heterologous A/G tail design (A/G tail). We evaluated the stability of our A/G tail in *Escherichia coli* and assessed its performance for mRNA translation both *in cellulo* and *in vivo*. We then compared the translation efficiency of seven different 5' UTRs from mammalian, viral, and synthetic origins in three different cell lines. The top three 5' UTRs were combined with three different 3' UTRs (AES-MT, a fragment of rotavirus gene 6 (VP6), and the human MnSOD 3' UTR [SOD]). Using a set of nine 5' UTR-3' UTR combinations on a reporter mRNA, we systematically evaluated their translation efficiency, stability, immunogenicity, and ribosome load. Additionally, we characterized UTRs structures/folding by circular dichroism. To further validate the potency of selected UTRs in a vaccination context, we quantitated their vaccination potency using Spike mRNA delivered as lipid nanoparticles (LNPs) in mouse models. Our findings demonstrate the therapeutic potential of mRNAs harboring A/G tail and VP6 or SOD 3' UTRs.

RESULTS

Alternative poly(A) tail

Stability of poly(A) tail sequences on DNA templates in bacteria

The presence of poly(A) tail in plasmid DNA templates for synthetic mRNA production is prone to truncation due to recombination events during bacterial growth. To overcome this instability, we proposed an alternative adenosine/guanosine mixed poly(A) tail (A/G tail) design using 12 repeating units of the AAAAAAAAAAG motif (Table S1). Guanosine residues are the most frequent non-adenosine nucleotides in poly(A) tails in humans and other species.^{20,21} Furthermore, guanylation has been reported to stabilize mRNA by reducing deadenylation^{20,22} and that cellular mRNAs with non-A tails are highly translated.²²

We compared the instability of three types of poly(A)-encoding sequences within plasmid template in bacteria: a homopolymeric

tail of 120 adenosines (A120), the poly(A) tail used in the Pfizer-BioNTech vaccine consisting of two tracts of 30A and 70A joined by a 10-nucleotide linker (A30L70 tail),¹⁸ and our novel A/G tail (Figure 1A; Table S1). We measured the length of the tail after 10 passages in bacteria by sequencing compared to the length onto the parent plasmid. We found that only 10% of the clones with A120 tail retained the full 120A tract, confirming the reported instability of homopolymeric A tails.¹⁷ In contrast, the A30L70 and A/G tails demonstrated high stability, with 90% and 100% of clones keeping the integrity of the poly(A) tail, respectively (Figure 1B). While the reduced instability of the A30L70 tail has been demonstrated in patents and clinical use,^{13,18} the A/G tail showed superior stability and appears to be a valuable alternative.

Structural properties of tail sequences

Next, we used synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) to determine the effect of poly(A) tail selection on mRNA conformation and stability.^{23,24} CD spectra of mRNA with different tail domains and transitions in secondary structure were monitored by SRCD thermal scans (15°C–95°C) (Figures 1C–1E). Positive bands at 180 and 260–265 nm and negative one between 200 and 210 nm are indicative for the constitutive A-form of mRNA.²⁵ Spectral profiles of mRNA with the three types of tails were very similar and indicative of A-form helices. As peaks between 260 and 270 nm are influenced by intra- and intermolecular base-pairing, that is base sequence, we monitored the SRCD changes at 260–265 nm, corresponding to different unfolding trajectories, to calculate melting temperatures (T_m) (Figure 1B). A30L70-tailed mRNA had a higher T_m ($76.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$) compared to A120 ($69.4^\circ\text{C} \pm 1.1^\circ\text{C}$) and A/G-tailed mRNA ($69.8^\circ\text{C} \pm 1.4^\circ\text{C}$). This indicates a stabilization effect of the 10 nt linker present in A30L70.

Evaluation in cellular models

To assess the expression potential of mRNAs with different tail compositions, we generated plasmids with A30L70 or A/G tails, both encoding the NanoLuc luciferase (Nluc) reporter gene, flanked by the benchmark human α -globin 5' UTR (hAg) and AES-mtRNR1 3' UTR (AES), with either A30L70 or A/G tails. ARCA-capped mRNAs were synthesized from these constructs and transfected into HeLa human cancer cells to compare their translation efficiency. Kinetic analysis revealed a biphasic pattern in protein expression: during the first 24 h post-transfection, no significant difference in bioluminescence was observed between A30L70-mRNA and A/G-mRNA. However, from 24 to 96 h, A30L70-mRNA exhibited a progressively higher bioluminescence signal, reaching up to 2-fold greater intensity at 96 h (Figure 2A).

The total amount of protein produced was quantified using area under the curve (AUC) analysis, which showed that A/G-mRNA produced 25% less protein overall compared to A30L70-mRNA (Figure 2B). These results indicate that while the A/G tail demonstrated comparable efficacy to A30L70, the latter confers a slight advantage in sustaining long-term protein expression.

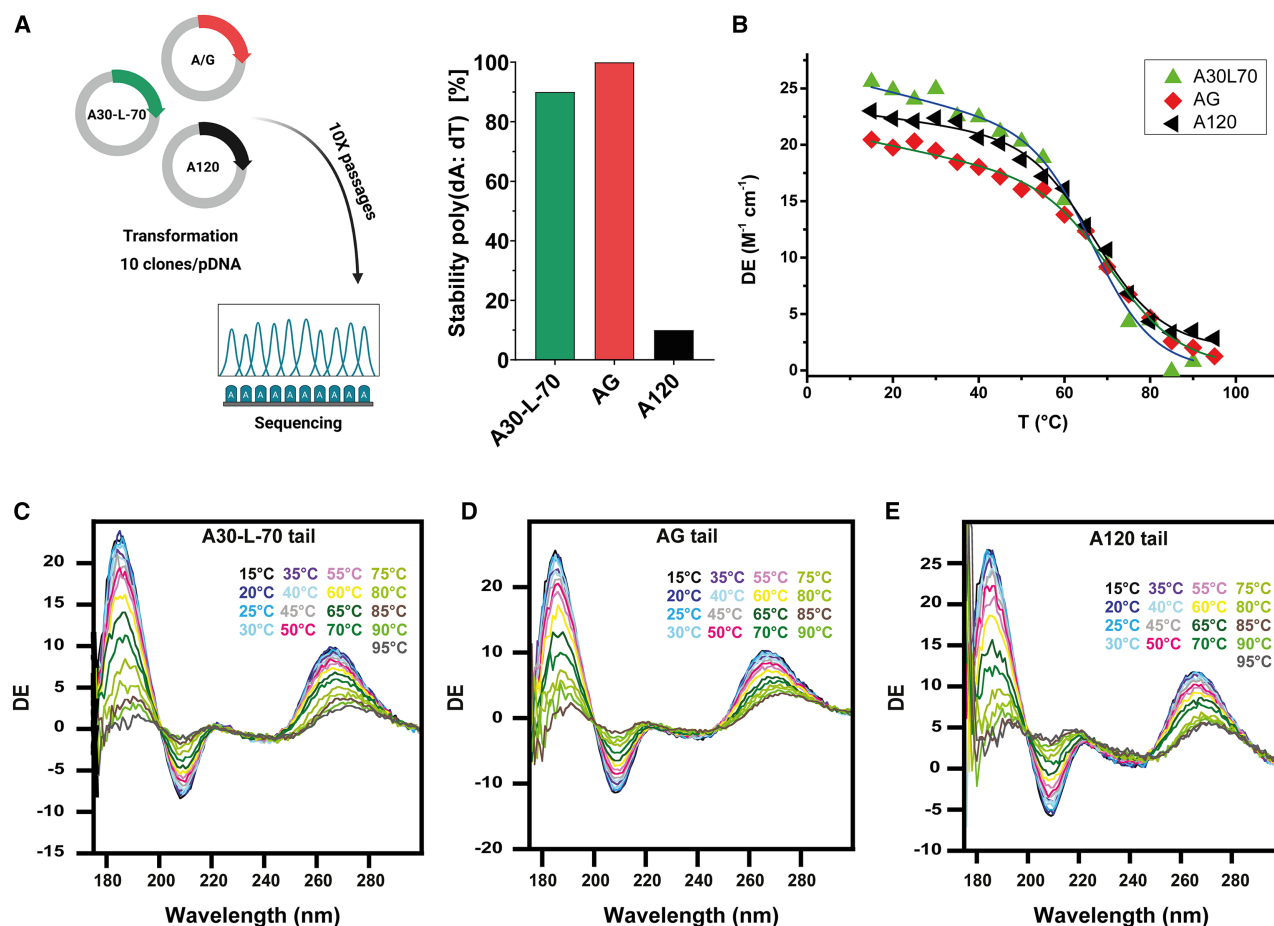


Figure 1. Stability of poly(A) tail sequences on DNA templates in bacteria and circular dichroism profiles of mRNA with the different poly(A) tails

(A) Tail stability of A30-L-70, AG, and 120A plasmids in *E. coli* DH5- α . The percentage of tail stability represents the proportion of clones maintaining tail integrity relative to the total number of clones. mRNA with different tail sequences were analyzed by synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) by performing a thermal scan from 15°C to 90 or 95°C. (B) Melting temperatures (T_m) of mRNA tails determined by SRCD analysis. (C) SRCD scans of A30-L-70 tail sequence, (D) SRCD scans of AG tail sequence, (E) SRCD scans of A120 tail sequence. DE, Delta Epsilon.

Evaluation in vivo

We next evaluated the impact of A/G tail on mRNA translation *in vivo*. LNPs with the same composition as the Pfizer-BioNTech vaccine²³ were used to deliver A30L70- or A/G-tailed mRNA encoding firefly luciferase (Fluc) by intramuscular injection (Figures 2C and 2D). As illustrated in Figure 2C, mRNAs with both tails exhibited comparable bioluminescence expression over the 72-h period post-administration. The AUC analysis revealed that A/G tail produced only 10% less total protein compared to A30L70 (Figure 2E). These results demonstrate that the A/G tail is as potent as A30L70 and represents a viable alternative for mRNA design.

5' UTR selection

The sequence and structure of the 5' UTR play a crucial role in mRNA translatability, as this region serves as the primary site for ribosome recruitment and translation initiation. Many researchers have attempted to optimize this region using diverse approaches, including the se-

lection of highly translated mRNAs and generation of de novo synthetic 5' UTRs based on high ribosome load.^{9–11} To identify the most effective 5' UTR from previous studies, we conducted a side-by-side comparison of the translation potency of both cap-dependent and cap-independent 5' UTRs. Our selection included the reference 5' UTR from human α -globin (hAg) used in the BioNTech COVID-19 vaccine^{10,11}; the human Hsp70 5' UTR reported to be a general enhancer of mRNA translation²⁶; the synthetic 5' UTR UTR4 allowing strong expression of mRNA in cells and Zebrafish²⁷; and the synthetic 5' UTR neoUTR3 showing enhanced protein production (UTR3).⁹ We also included the human vascular endothelial growth factor and type-1-collagen-inducible protein (VCIP) IRES²⁸; the encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES²⁸; and the IRES from Cricket paralysis virus (CrPV) that is able to directly recruit the 60S subunit.²⁹ Each of these 5' UTRs was cloned upstream of the Nluc reporter gene (Figure 3A), and the resulting constructs were transcribed into mRNAs with A/G tail. These mRNAs were then delivered into

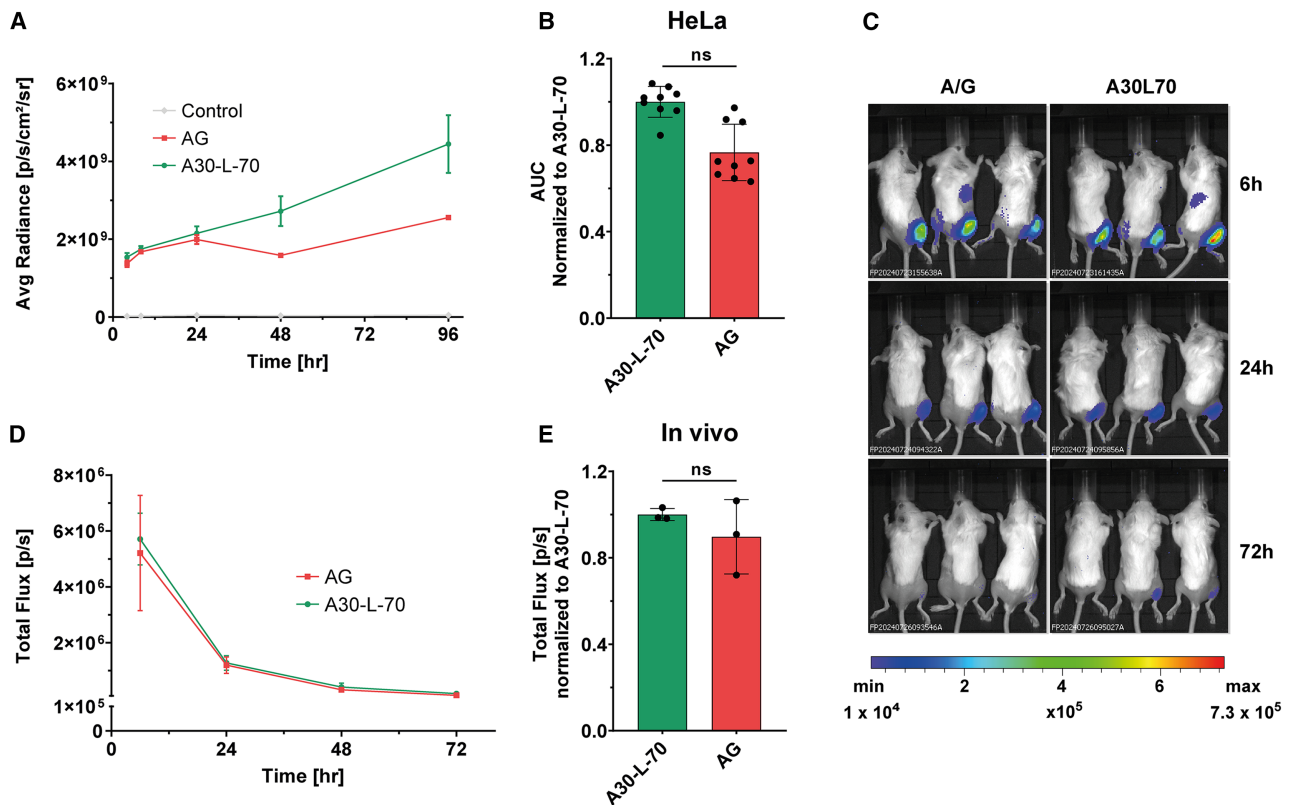


Figure 2. The potency of a novel heterologous poly A/G tail

(A) Time course analysis of nano luciferase reporter gene (Nluc) expression in HeLa cells transfected with A30-L-70 and AG ARCA-mRNAs. The measurements were acquired at 4, 8, 24, 48, and 96 h post-transfection, and results are expressed as mean $\pm$ SD. Control is untransfected cells. (B) Based on these data, total protein expression over time (the area under the curve) was calculated and normalized to A30-L-70 mRNA. Statistical significance was assessed by nested one-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ($n = 3$ independent experiments, each three technical replicates). (C) *In vivo* translation of firefly-luciferase-encoding (Fluc) mRNAs containing AG or A30-L-70 tails in BALB/c mice after i.m. injection (one experiment with three mice per group). (D) Quantification was done for all available mice per time point (6, 24, 48, and 72 h); (E) total protein expressed over time (the area under the curve) was calculated and is normalized to that of the A30-L-70 containing mRNA. One-way ANOVA, Tukey's post-test; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

HeLa cells, murine myoblasts (C2C12), and murine dendritic cells (DC2.4) to evaluate their translation efficiency.

Bioluminescence was evaluated 24 h post-transfection. The results showed that the translation of mRNAs containing IRES 5' UTRs derived from mammalian or viral sources (VCIP, CrPV, EMCV) was less than 20% of the luciferase expression achieved with the cap-dependent human alpha-globin 5' UTR across the three cell lines tested (Figures 3B–3D). This inefficient translation of mRNAs harboring viral IRES sequences may be attributed to several factors, including the structural folding of the IRES region within the IVT mRNA and the cellular environment, as IRES elements are known to function more effectively under stress conditions.³⁰ Contrary to previous studies that reported higher translation efficiency of VCIP IRES compared to EMCV IRES in cell lines using bicistronic plasmid DNA,²⁸ our findings demonstrated similarly low translation potency for both IRES elements in the tested cell lines. Importantly, cell viability remained at or above 90% for all mRNAs, indicating

good tolerability of mRNAs with these 5' UTR sequences (data not shown).

Interestingly, the performance of the Hsp70 5' UTR varied among the three cell lines: it exhibited lower translation efficiency than α -globin in C2C12 cells, equivalent performance in HeLa cells, and superior translation in DC 2.4 cells. The higher expression of Hsp70 5' UTR-mRNA in DC 2.4 may be attributed to an enhancer element in its sequence and to its capability to promote translation via both cap-dependent and cap-independent mechanisms.^{26,31} Furthermore, this increased expression over the mRNAs harboring viral IRES 5' UTRs is consistent with findings from previous studies.³¹ We also observed comparably high Nluc expression levels with mRNAs containing hAg, UTR3, or UTR4 5' UTRs across all three cell lines tested. These results illustrated that cap-dependent 5' UTRs exhibit significantly higher translation efficiency compared to cap-independent 5' UTRs. Consequently, human alpha-globin, neoUTR3, and UTR4 5' UTRs were selected for further investigations on 3' UTR selection.

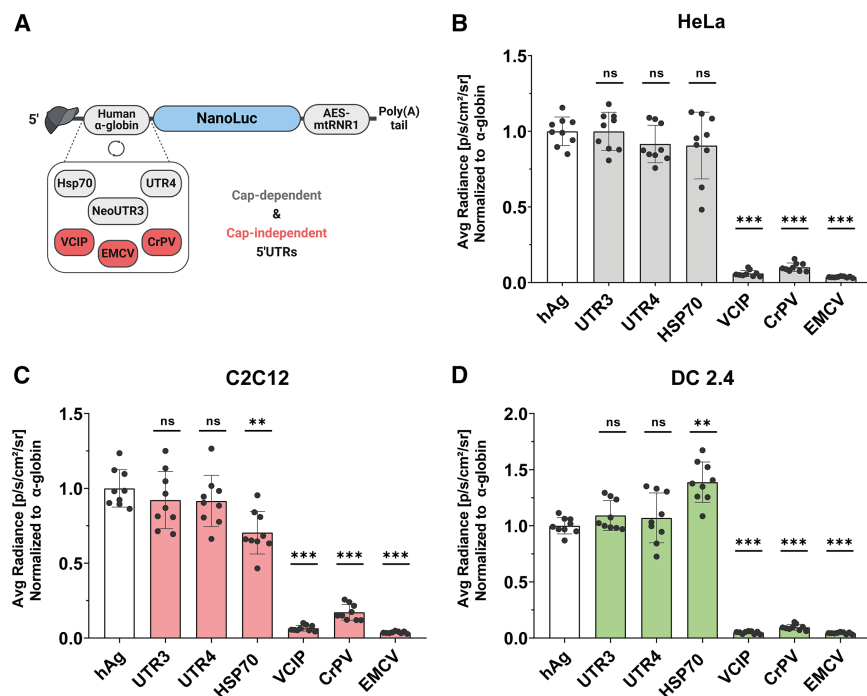


Figure 3. In cellulo comparison of cap-dependent and cap-independent 5'UTRs

(A) Schematic representation of 5' UTR motifs cloned upstream of the nano luciferase reporter gene (Nluc). (B–D) After transfection of the respective mRNAs into cell lines, luciferase activity measured in relative light units (RLU) 24 h after transfection. Data are presented as the mean $\pm$ SD in HeLa (B), C2C12 (C), or DC2.4 cells (D). Statistical significance was assessed by nested one-way ANOVA. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. (n = 3 independent experiments, each three technical replicates).

Evaluation of 5' UTR/3' UTR combinations in cell models

To identify the most potent 5' UTR-3' UTR combination, we used three 5' UTRs from the previous selection (hAg, UTR3, and UTR4) and three 3' UTRs selected from the literature: AES-mtRNR1 3' UTR (AES),¹² a fragment of rotavirus gene 6 3' UTR (VP6),³² and the human MnSOD 3' UTR (SOD).³³ This resulted in a total of nine combinations (Figure 4A), including the benchmark 5' UTR hAg/3' UTR AES. We performed a comprehensive *in cellulo* comparison of these combinations by evaluating their translation efficiency, mRNA half-life, immunogenicity, and capacity to recruit ribosomes. Additionally, the structure of selected 5' and 3' UTRs was elucidated using circular dichroism, aiming to establish a functional-structural relationship (Figure S1).

Evaluation of translation in cell lines

First, we monitored the kinetics of mRNA translation of the nine UTR combinations in HeLa cells, C2C12 cells, and DC 2.4 cells, by measuring bioluminescence at different time points (4–96h) post-transfection; total protein production over time was determined by calculating the area under the curve (AUC). As shown in Figures 4B and 4C, eight of the nine combinations tested had similar translation kinetics and total protein production over time in HeLa cells. The UTR4-SOD mRNA was the only mRNA that produced less protein than the benchmark. Noteworthy, in C2C12 cells, hAg-VP6 and hAg-SOD combinations produced significantly a higher amount of protein than the benchmark (Figure 4D). Oppositely, the other mRNAs showed the same pattern as in HeLa cells (Figure 4C). Remarkably, in DC 2.4, we found that the UTR4-SOD mRNA pair was translated 2-fold

less than the benchmark, while the other mRNAs showed similar protein expression (Figure 4E).

Vaccination is the only approved application of synthetic mRNA.^{2,4} COVID-19 vaccines required intramuscular administration of mRNA-LNP and expression of the mRNA-encoded antigen in antigen-presenting cells such as dendritic cells (DC) to induce a protective immune response.³⁴ Accordingly, we evaluated the nine UTR combinations in functionally

relevant AB1079-immortalized human myoblasts (Figure 4F) and human monocyte-derived DCs (MoDCs) (Figure 4G). The results in AB1079 cells mirrored the pattern obtained in C2C12 cells, except for UTR3-SOD, UTR4-VP6, which produced 25% less protein, and UTR4-SOD mRNA, which produced less than 50% of the protein compared to the benchmark mRNA (Figure 4F). In MoDCs, five of the nine mRNAs tested were similarly translated (hAg-AES, hAg-VP6, hAg-SOD, UTR3-AES, and UTR4-AES), and mRNA with 3' UTR VP6 or SOD in combination with UTR3 or UTR4 5' UTRs resulted in decreased mRNA translation (Figure 4G). A possible explanation for the lower expression of UTR4-SOD mRNA could be a difference in interferon pathway activation, resulting in decreased mRNA translation.³⁵ However, all the constructs had the same percentage of dsRNA content (Table S2) and induced comparable activation of the interferon pathway in DC2.4 cells (Figure S2). Furthermore, in cell-free translation assays, the nine mRNAs were similarly translated (Figure S3A), suggesting that the differences observed in the different cell lines may be due to the cell environment/context/specificities and/or competition with endogenous mRNAs.³⁶ Moreover, the translation of all constructs except CrPV was inhibited by 90% using the canonical eIF4G initiation pathway inhibitor (4EGI-1).

As the choice of cap analog influences the initiation of translation, we also evaluated the translatability of three mRNAs harboring the CleanCap AG trinucleotide cap analog used in the Pfizer-BioNTech vaccine.^{37,38} We compared the translation efficiency of ARCA- and CleanCap-AG-capped mRNA with alpha-globin as 5' UTR in DC2.4 cells and MoDCs. The results showed similar patterns for

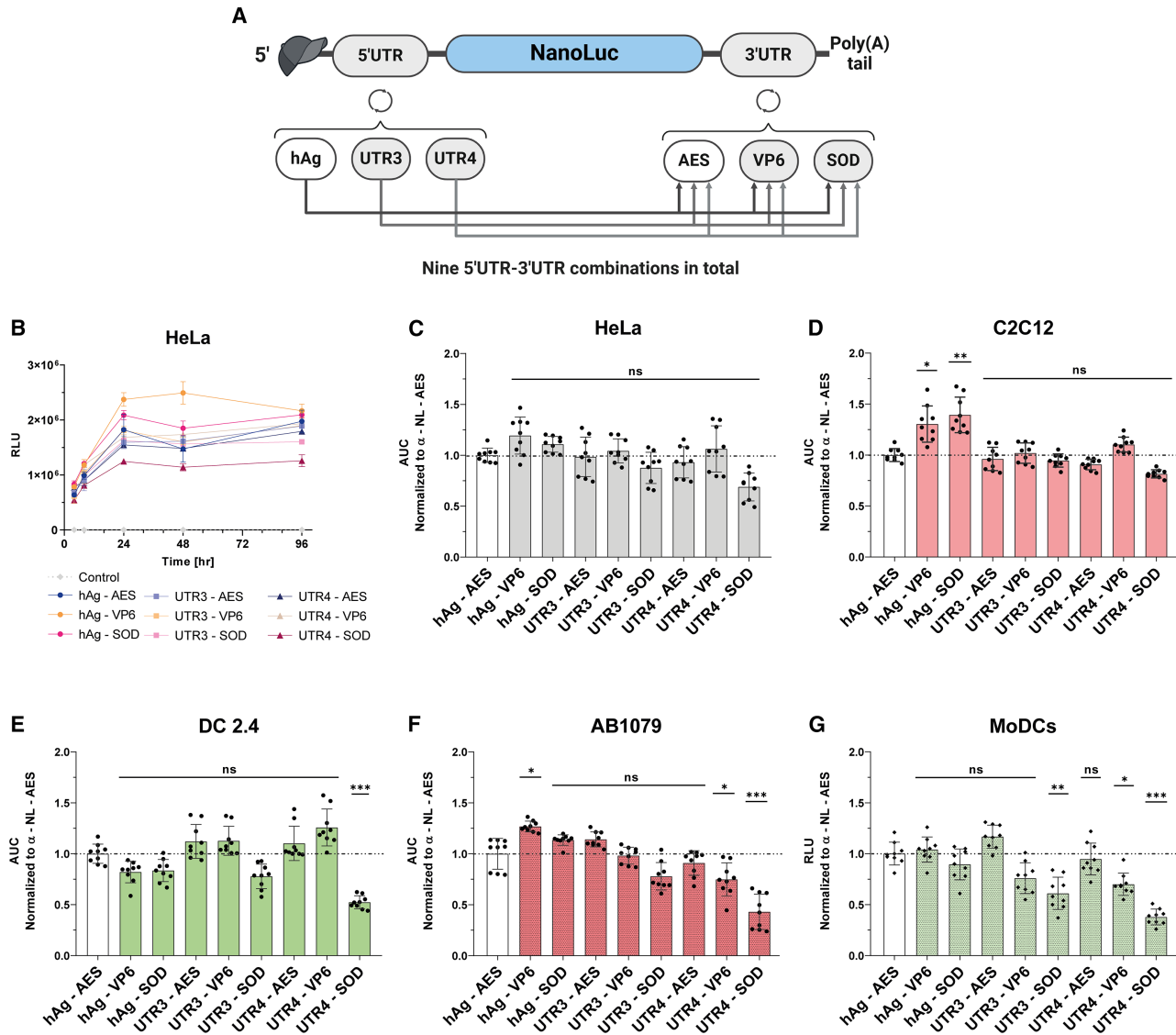


Figure 4. Evaluation of 5' and 3' UTR combinations in cell models

(A) Schematic representation of nine constructs generated by cloning different 5' UTR motifs upstream and 3' UTR motifs downstream of the nano luciferase reporter gene (Nluc). (B) Time course analysis of Nluc expression in HeLa cells transfected with the nine mRNA constructs. Bioluminescence was acquired at 4, 8, 24, 48, and 96 h post-transfection, and results are expressed as mean $\pm$ SD. (C–F) Total protein expression over time (area under the curve) calculated from time course data and normalized to the hAg 5'UTR-AES 3'UTR containing mRNA in HeLa cells (C), or murine myoblasts (C2C12) (D), or murine dendritic cells (DC2.4) (E), or human myoblasts (AB1079) (F). Statistical significance was assessed by nested one-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (three independent experiments with three technical replicates). (G) The nine mRNAs were transfected to monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). Relative light units (RLU) were measured 24 h post-transfection. Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance was assessed by nested one-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ($n = 3$ independent donors, each three technical replicates).

the three mRNAs regardless the cap analog. However, as expected, mRNAs with CleanCap AG yielded two times more protein than mRNAs with the ARCA cap analog (Figure S4). Altogether, these results prove that the expression is cell-type dependent, relieving the difficulty in predicting the efficacy of UTR combinations and reinforcing the need for evaluation in cellular and *in vivo* models.

Half-life and polysome profiling of mRNAs with UTR combinations

To understand the difference of protein production observed previously, we analyzed the most likely reasons for differences in translation efficiency: the mRNA half-life, ribosomes loading, and UTR structures.^{12,39}

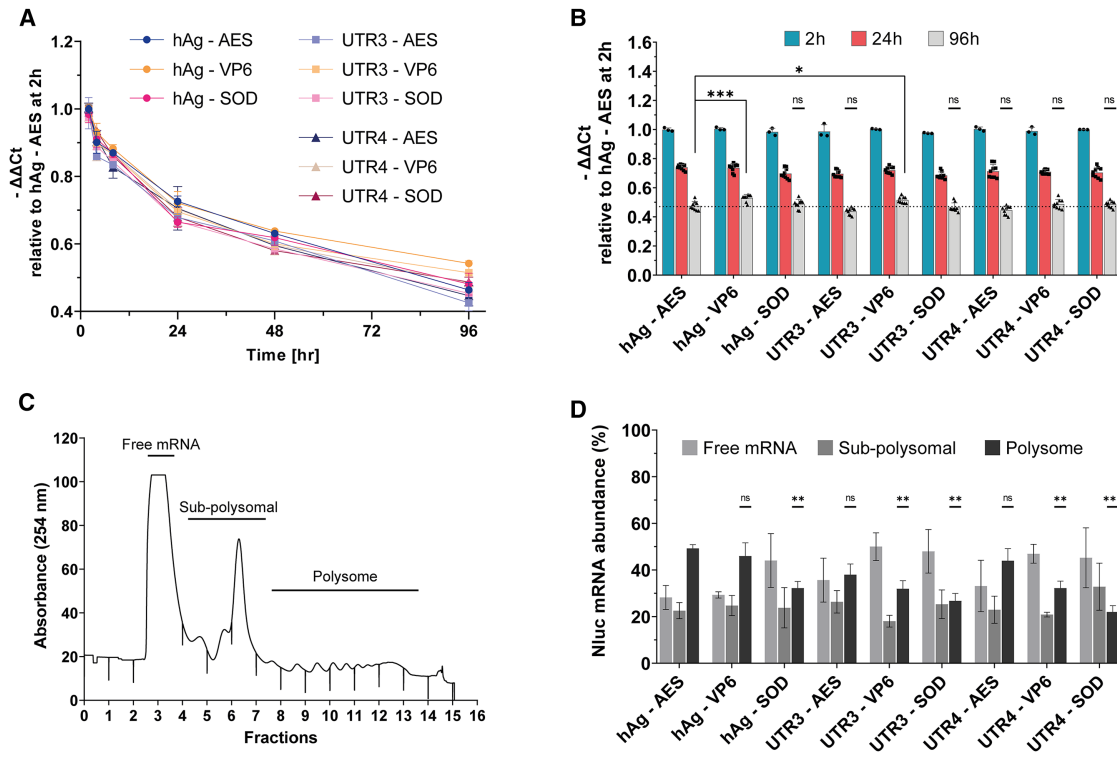


Figure 5. mRNA stability and ribosome load capacity

(A) Average stability of the mRNA was assessed by RT-qPCR harvested at the indicated time points. The transcript levels were determined via $\Delta\Delta Ct$ calculation relative to hAg-AES mRNA and are shown relative to the 2 h. (B) Nluc mRNA levels at 2, 24, and 96 h relative to 5'hAg-3'AES at 2 h. Data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance for 96 h was assessed by nested one-way ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C) Polysome profile from HeLa cells 24 h after transfection, analyzed on a 10%–50% sucrose gradient. (D) Nluc mRNA levels assessed by RT-qPCR from each polysome fraction and presented in three groups: free mRNA, sub-polysomal-associated mRNA, and polysome-associated mRNA. Results are expressed as mean $\pm$ SD of two independent experiments with three technical replicates. Statistical significance for polysome fraction was assessed by one-way ANOVA, Dunnett's post-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

mRNA stability

To assess the stability of the 9 mRNAs, HeLa cells were transfected with Nluc mRNAs, and RT-qPCR was performed at different time points (2–96 h) to measure their half-life. All tested mRNAs exhibited a similar time-dependent decay and a comparable half-life, except for mRNA hAg-VP6, which seemed to be slightly more stable than the benchmark mRNA, especially after 96 h (Figures 5A and 5B). We completed mRNA half-life measurements with a comparison of mRNA content of cells treated with mRNA harboring different 5' UTR α -globin combinations at the single-cell level using FISH-Flow.⁴⁰ FISH-Flow results showed comparable Nluc mRNA levels at 2 and 24 h after transfection for hAg-AES, hAg-VP6, and hAg-SOD mRNAs (Figure S5A). These results supported similar kinetics decay for the nine mRNA transcripts, indicating that the difference observed in translation potency is not caused by mRNA half-life.

Polysome profiling

Increased translation efficiency of a particular UTR combination would be expected to result in its accumulation in polysomal fractions. To investigate this, HeLa cells were transfected with IVT Nluc mRNA

harboring the nine UTR combinations and harvested after 24 h. Cytoplasmic extracts were then fractionated on 10% to 50% sucrose gradient, and RT-qPCR was performed on each fraction. All HeLa cells transfected with different mRNAs exhibited similar sub-polysomal (40S, 60S, and 80S) and polysomal profiles (Figure 5C). However, the distribution of IVT Nluc mRNA within polysome fractions varied among the UTR combinations. Notably, hAg-AES, hAg-VP6, and UTR4-AES showed more pronounced association with polysomes, while UTR3-SOD and UTR4-SOD showed lower association (less than 25%) (Figure 5D). Interestingly, these two mRNAs (UTR3-SOD and UTR4-SOD) with reduced polysomal abundance also yielded less protein than the benchmark mRNA (Figure 4). This polysome profiling analysis revealed that the efficiency of mRNA translation depends on the specific combination of 5' UTR and 3' UTR sequences, rather than only on the 5' UTR sequence.

The SRCD with thermal scans (15°C–95°C) was used to compare the structure and T_m of each UTR. 5' UTRs and 3' UTRs exhibited very similar CD spectra (Figure S1). However, UTR4 had a drastically lower T_m (59.6°C $\pm$ 1.6°C) compared to hAg (79.2°C $\pm$ 0.9°C) and UTR3 (76.3°C $\pm$ 0.9°C). T_m of the 3' UTRs were

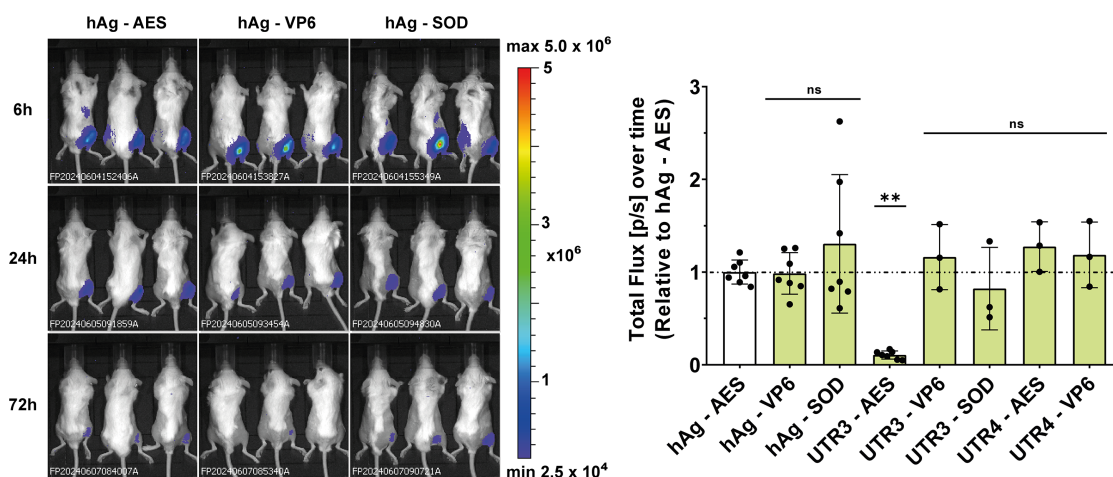


Figure 6. Evaluation of 5' and 3' UTR combinations in mice

Bioluminescence imaging of firefly luciferase (FLuc) expression in BALB/c mice following intramuscular (i.m.) injection of mRNA constructs. Representative images of three mice per group are shown at 6, 24, and 72 h post-injection. Quantification was done for all available mice per time point (6, 24, 48, and 72 h). Total protein expressed over time (the area under the curve) was calculated and is normalized to that of the hAg 5'UTR- AES 3'UTR containing mRNA. One-way ANOVA, Tukey's post-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (one experiment with three to seven mice as indicated).

equivalent: $76.6^{\circ}\text{C} \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ for AES-mtRNR1, $76.4^{\circ}\text{C} \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ for VP6, and $69.7^{\circ}\text{C} \pm 5.7^{\circ}\text{C}$ for SOD.

Taken together, these results suggest that the observed differences in total protein production among mRNAs UTR combinations can be attributed to ribosome loading rather than to mRNA stability or immunogenicity.

Evaluation of 5' UTR/3' UTR combinations *in vivo*

To assess the suitability of UTR combinations for therapeutic applications, eight UTR combinations were evaluated *in vivo* in mouse models using firefly luciferase as a reporter gene. The combination 5' UTR4-3' SOD was excluded from the study due to its low translation efficiency especially in MoDCs (Figure 4G). BALB/c mice received 1 μg of mRNA LNPs via intramuscular injection (Figure 6). Luciferase activity was imaged at different time points, and total protein production was calculated after 72 h. Total protein production reached equivalent levels for all mRNAs except for UTR3-AES mRNA, which produced 10-fold less protein than hAg-AES mRNA (Figure 6). The poor translation of the UTR3-AES combination *in vivo* was not expected, as it had performed well in cell lines with nanoluciferase. In line with the *in vivo* findings, the transfection of HeLa cells with Fluc mRNA containing UTR3-AES resulted in lower protein production than the benchmark mRNA (hAg-AES) (Figure S6). To investigate this unexpected poor performance of UTR3-SOD Fluc mRNA, we conducted an *in vitro* translation assay using preheated and unheated mRNA. Interestingly, the preheated UTR3-AES Fluc mRNA produced two times more protein than the unheated mRNA, whereas UTR3-VP6 Fluc mRNA produced the same amount of protein regardless of preheating (Figure S3B). Additionally, SRCD analysis showed that UTR3-AES Fluc mRNA had a different profile compared to UTR3-VP6

Fluc mRNA, suggesting that UTR3-AES Fluc mRNA is structured and potentially less accessible to the ribosome (Figure S7). These results indicate that the sequence of the coding region may interfere with the folding of the 5' UTR and 3' UTR, leading to a conformation of the mRNA less favorable for translation.

Based on the previous results, three combinations featuring the human alpha-globin as the 5' UTR were selected for validation using mRNA that encodes the SARS-CoV-2 spike protein in a vaccination context.

Evaluation of therapeutic potential

After conducting a comprehensive study of the 5' and 3' UTR combinations in various cell models and *in vivo* using reporter genes (nano and firefly luciferases), we selected the three UTR combinations with human alpha-globin as 5' UTR (hAg-AES, hAg-VP6 and hAg-SOD) along with the A/G tail. To assess the potential utility of these selected UTRs in the context of vaccine application against SARS-CoV-2, we replaced Nluc with the optimized spike protein sequence used in the Comirnaty mRNA vaccine.

First, we compared modified (m1 Ψ) with unmodified Spike mRNA in HeLa cells. The results showed that the modified mRNA yielded 10 times more than the unmodified mRNA (Figure S5B). We then evaluated the three m1 Ψ mRNAs in HeLa cells and AB1079 myoblast cells. The VP6 and MnSOD 3' UTRs produced more spike protein than the AES-mtRNR1 3' UTR (Figures 7B and 7C), which is consistent with previous results using the Nluc reporter protein (Figures 4C and 4F).

Finally, we administered LNP-formulated spike-encoding mRNA intramuscularly (i.m.) to BALB/c mice ($n = 5$). Mice were

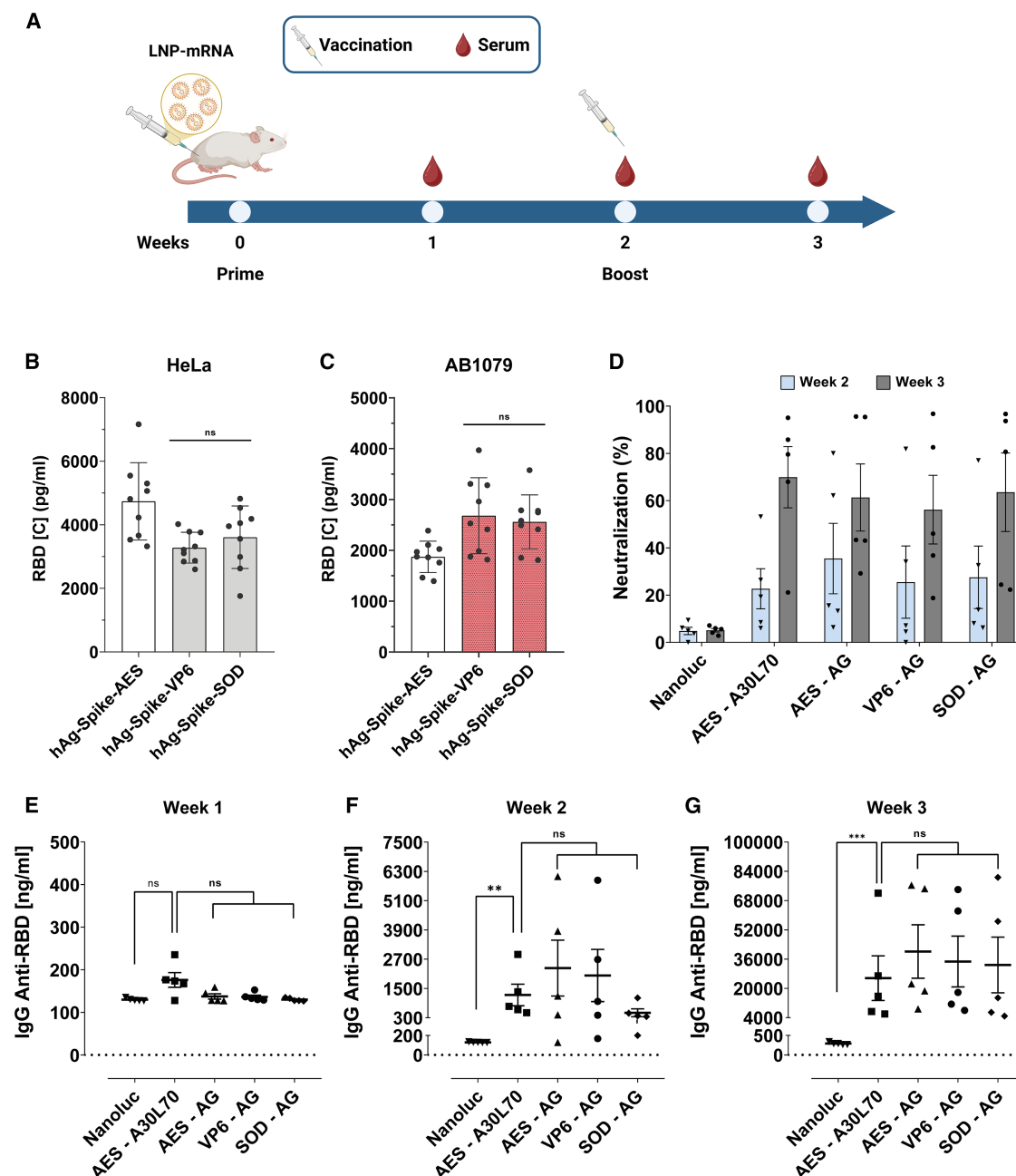


Figure 7. Spike-encoded mRNA and investigating vaccine immunogenicity in mice

(A) Schedule of vaccination and serum collection. (B and C) After transfection of the modified (m1Ψ)-spike mRNA into cells, the spike protein was measured using ELISA 24 h post-transfection. Data are presented as the mean $\pm$ SD for HeLa cells (B) and AB1079 cells (C). Statistical significance was assessed by nested one-way ANOVA. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. (three independent experiments with three technical replicates). BALB/c mice were immunized twice with 5 μ g of spike-encoded modified (m1Ψ) mRNA-LNP at weeks 0 and 2. Mice in the mock group received nanoluciferase mRNA-LNP. Spike-protein-specific IgG titers were measured at weeks 1, 2, and 3 (E–G), while neutralizing antibodies were assessed at weeks 2 and 3 (D) using ELISA ($n = 5$). Statistical significance was assessed by Kruskal-Wallis test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (one experiment with five mice per group). AES, AES-mtRNR1.

immunized twice (on days 0 and 14) with LNP-formulated spike mRNA containing hAg-AES, hAg-VP6, or hAg-SOD UTR combinations with A/G tail and the benchmark Comirnaty (hAg-AES with

A30L70 tail). Antibody responses against spike (total immunoglobulin G [IgG] and neutralizing antibodies) were measured by ELISA at different time points (Figure 7A). Two weeks after the first

injection, mRNA with AES-mtRNR1 or VP6 3' UTRs induced higher production of IgG anti-RBD spike protein compared to the SOD 3' UTR mRNA (Figure 7F). Interestingly, 1 week after the second injection (boost), no significant differences in IgG production were observed among the three 3' UTRs (Figure 7G). Regarding the tails, the A/G tail revealed a tendency of higher IgG production after 2 and 3 weeks compared to the A30L70 tail, although the difference was not statistically significant (Figures 7F and 7G). While there were some variations in IgG production, neutralizing antibody responses were similar across groups, with a marked increase following the booster injection (Figure 7D). Altogether, these results demonstrate the potential of VP6 and SOD 3' UTRs, as well as the A/G tail, as viable alternatives to AES-mtRNR1 and A30L70, respectively, in the context of mRNA vaccine development.

DISCUSSION

Translation efficiency and mRNA stability of synthetic mRNA are directly linked to its design elements (Cap, UTR, codon usage, and poly(A) tail), IVT parameters, and downstream purification. Optimizing these elements presents a significant challenge in developing effective mRNA therapeutics. Our study aimed to enhance the potency of synthetic mRNA and establish an informed structure-activity relationship by systematically evaluating different 5'/3' UTR combinations and a novel poly(A) tail.

The instability of the traditional poly(A) tail during plasmid amplification in bacterial systems presents a significant challenge in mRNA production. This instability, characterized by shortening of the poly(A) sequence, directly affects the translation efficiency of the mRNA.¹⁷ To address this issue, researchers have explored different approaches, such as including an internal 10-nucleotide linker into the poly(A) stretch.¹⁸ In our study, we proposed a novel solution consisting of a heterologous poly(A/G) tail. This A/G tail demonstrated superior stability compared to BioNTech's A30L70 tail in bacterial systems while maintaining comparable expression levels of reporter gene *in cellulo* and *in vivo*. Moreover, it yielded similar results in vaccination against SARS-CoV-2. The structural analysis revealed that the A30L70 and A/G tails exhibited a similar T_m and SRCD profiles, suggesting comparable structural properties. The enhanced performance of the A/G tail may be attributed to increased mRNA stability within cells. Previous studies have shown that the incorporation of non-A nucleotides, particularly guanosine, can interfere with the deadenylation process, thereby enhancing mRNA stability.⁴¹ A recent study by Liu et al. reported that mRNA tails containing C and G residues were more efficiently translated than mRNA with pure A tails in HeLa cells.²² This study did not evaluate stability of templates nor translation efficiency in human primary cells or *in vivo*. Our A/G tail can be further improved by optimizing the percentage of G residues and overall tail length for improved performance. Moreover, future studies will evaluate the binding of poly(A)-binding proteins (PABPs).

Another key element in mRNA translation efficiency and stability is the 5' and 3' UTRs. Unlike previous studies that focused on separate

optimization of 5' or 3' UTR, we conducted a comprehensive side-by-side comparison of various combinations of 5' and 3' UTR derived from mammalian, synthetic, and viral origins. Our results demonstrated that cap-independent 5' UTRs exhibited a poor translation rate across three different cell lines compared to cap-dependent 5' UTRs, which is consistent with previous studies showing that IRES are more efficient under stress conditions.^{42,43}

The evaluation of the combinations of three cap-dependent 5' UTRs (hAg, UTR3, and UTR4) with three 3' UTR sequences (AES, VP6, and SOD) in various cellular models revealed that improved protein production was due to increased protein translation efficiency rather than enhanced mRNA stability (Figures 4 and 5). The interactions between 5' and 3' UTR are crucial and can modulate the mRNA translation efficiency.⁴⁴ Our result showed that the 5' UTR hAg yielded similar results regardless the 3' UTR sequence across different cell models, suggesting that the 5' UTR is the primary driver for protein translation from synthetic administered mRNA. However, the synthetic 5' UTR UTR4 yielded different results depending on the paired 3' UTRs (Figure 4), especially in MoDCs. Despite the 5' UTR UTR4 being identified in high ribosome load analysis,²⁷ when paired with 3' UTR SOD, it yielded 2-fold less protein compared to the reference (Figure 4). This observation is supported by the polysome profiling results (Figure 5), suggesting that ribosome load on mRNA is influenced by the 5' and 3' UTR base-pairing interactions.

The *in vivo* evaluation of these 5' and 3' UTR combinations highlighted the fact that open reading frame (ORF) may affect the mRNA secondary structure and, consequently, impact its translation efficiency.⁴⁵ The 5' UTR neoUTR3 paired with the 3' UTR AES-mtRNR1 yielded different results depending on the ORF used. With nanoluciferase ORF, protein levels were similar to the benchmark, whereas with firefly luciferase ORF, they were 10-fold lower compared to the benchmark *in vivo*. A possible explanation is the interaction between the UTRs and the Fluc ORF, leading to mRNA folding that is not suitable for efficient translation.⁴⁶ We confirmed this hypothesis through *in vitro* translation assays and SRCD analysis (Figures S3B and S6).

We validated the identified 3' UTR motifs (VP6 and SOD) paired with hAg in vaccination study using SARS-CoV-2 spike protein-encoding mRNA delivered as LNPs. By selecting the 3' UTRs, we improved protein yields by 40% compared to the benchmark in human muscle cells (Figure 7). However, *in vivo* immunization tests showed comparable levels of antigen-specific IgG production and neutralizing antibodies across the groups (Figure 7).

In addition to optimizing synthetic mRNA sequences, the parameters of the IVT and the choice of downstream purification are crucial for improved translation efficiency. We demonstrated that purification using oligo dT magnetic beads reduced but did not completely eliminate double-stranded RNA (dsRNA) contamination (Table S3). Interestingly, the use of m1Ψ led to decreased dsRNA levels, as did

the use of CleanCap AG compared to ARCA cap analog (Table S3). CleanCap AG yielded up to 2-fold more expression compared to ARCA in DC2.4 and MoDCs (Figure S4), likely due to higher capping efficiency (up to 98%) and lower dsRNA levels.

The rational approach used in our study to compare poly(A) tails and UTR sequences has broad applications for examining the effects of mRNA sequence engineering on translation. In contrast to previous studies that optimize mRNA domains separately, our study highlights the importance of considering the entire mRNA sequence, the production parameters of IVT mRNA, and the target cell types of the desired application, as factors regulating translation and mRNA stability are cell-type-specific.

We believe that the presented results may be valuable for developing a new tool for mRNA-based therapeutics optimization based on high ribosome load that considers the full mRNA sequence and intracellular environment for a precise optimization of therapeutics mRNA.

MATERIALS AND METHODS

DNA templates preparation

The plasmid pFR_CrPV_xb containing the CrPV 5' UTR was a gift from Phil Sharp (Addgene plasmid # 11509).⁴⁷ The R5 EMCV plasmid was a gift from Vincent Mauro (Addgene plasmid # 51733).⁴⁸ UTR sequences from neoUTR3,⁹ MnSOD,³³ VP6,³² hsp70,²⁶ and poly(A) tails were synthesized by GenScript (Ryswick, the Netherlands). The SARS-CoV-2 spike glycoprotein sequence based on BNT162b1 was synthesized by GenScript. pF4AgNanoLuc (ATG-42) was a gift from Lance Encell (Addgene plasmid # 137777).⁴⁹

To generate the plasmids used in this study, UTR sequences and coding sequences (CDS) for firefly luciferase (Fluc) or SARS-CoV-2 Spike protein were cloned into the pF4Ag vector. The constructs were verified by restriction enzyme analysis and Sanger sequencing performed by Eurofins (Ebersberg, Germany). The generated plasmid DNA (pDNA) was amplified in *E. coli* DH5 α and purified using a NucleoBond Xtra Midi Plus Kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions.

In vitro transcription of mRNA

For IVT mRNA production, plasmids were linearized and purified from gel using the NucleoSpinGel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). Capped-mRNA with Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) or CleanCap Reagent AG (Trilink) was produced by *in vitro* transcription using the HighYield T7 RNA Synthesis Kit from Jena Biosciences according to the manufacturer's protocol. The resulting IVT mRNA was purified using the Monarch RNA Cleanup Kit (NEB). Depending on experiments, additional purification with Oligo d(T)25 Magnetic Beads (NEB) was performed as described previously.⁵⁰ The integrity and quality of the purified mRNA was verified by capillary electrophoresis using an Agilent 2100 Bioanalyzer. Double-stranded RNA (dsRNA) contamination was quantified using a dsRNA ELISA Kit (Nordic Mubio) following

the manufacturer's instructions. Results of mRNA quality analysis and dsRNA contamination levels are presented in Figure S8 and Tables S2 and S3.

Stability of Poly(A) tails in *E. coli*

E. coli clones carrying plasmid DNA (pDNA) with A120, A30L70, or A/G tails were passaged 10 successive times in LB broth containing ampicillin selection antibiotic (Merck). After passage 10, bacterial suspensions were harvested, and pDNA was purified using a NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey Nagel). Integrity of tails was verified by Sanger sequencing performed by Eurofins (Ebersberg, Germany).

Synchrotron radiation circular dichroism

We followed the protocol described in Wien et al.²⁵ to record SRCD spectra of mRNA. Spectral magnitudes were calibrated using a solution of camphorsulfonic acid (CSA) at a known concentration. mRNA was diluted in HEPES buffer pH 7.5, 2.5 mM MgSO₄ at a final concentration of 1–5 mg/mL. CD spectra were recorded in CaF₂ cuvettes with a 65 μ m path and an acquisition window between 170 and 320 at a 1 nm bandwidth. The buffer spectrum was subtracted from the sample spectra. We performed thermal scans from 15°C to 95°C (every 5°C or 8°C). Spectra were analyzed using CDTToolX: Version 2.1.⁵¹ Data were expressed as delta epsilon (DE) and normalized to sample concentration. We used Origin for curve fitting.

Cell culture

Cell lines

C2C12 murine myoblasts and HeLa human ovarian carcinoma cells were purchased from the American Type Culture Center. C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle media (DMEM, Sigma) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 1% antibiotics (Sigma). HeLa cells were cultured in Minimum Eagle Media containing 10% FBS and 1% antibiotics. AB1079 are immortalized human myoblasts isolated from a 38-year-old healthy individual, as described in Mamchaoui et al.⁵² AB1079 were cultured in skeletal cell growth medium containing 50 μ g/mL fetuin, 10 ng/mL recombinant human epidermal growth factor, 1 ng/mL recombinant human basic fibroblast growth factor, 10 μ g/mL recombinant human insulin, and 0.4 μ g/mL dexamethasone (PromoCell). DC2.4 murine DC cells were a gift from Kenneth L. Rock.⁵³ DC2.4 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. All cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Monocyte-derived dendritic cells

Venus blood samples were purchased from Etablissement Français du Sang (Maison du don-EFS Orléans). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll density gradient centrifugation (11753219, Fisher Scientific) at 2,000 rpm for 20 min. Monocytes were then isolated using Dynabeads Untouched Human Monocytes Kit following manufacturer's protocol. Monocytes were differentiated into MoDC by cultivating 5 days in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, human

interleukin-4 (IL-4) (62.5 ng/mL), and human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (75 ng/mL).

mRNA transfection

All cell lines were confirmed mycoplasma-free using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza). One day before transfection, cells were seeded in 96-well plates at densities of 10,000 cells per well for HeLa, AB1079, and C2C12 lines and 20,000 cells per well for DC2.4 and MoDCs. The transfection was performed with Lipofectamine MessengerMAX (LFM, Thermo Fisher) following the manufacturer's recommendations, with 100 ng of capped-mRNA per 10,000 cells. Transfection with LFM did not induce detectable cytotoxicity (Figure S9).

LNP preparation

LNPs were formulated using the same lipid composition as the Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine,³⁸ consisting of ALC 0315, DSPC, cholesterol, and ALC-0159 with a molar ratio of 50:10:38.5:1.5 and a nitrogen-to-phosphate ratio of 6. mRNA and lipid solution were mixed at a 1:3 volume ratio using the Fluigent microfluidic system (Fluigent, France) equipped with a Herringbone Mixer chip Fluidic 1460 (Chipshop). LNP characterization was performed as described previously.⁵⁴ The resulting LNPs measured 95–120 nm with a PDI <0.2 (Figure S10) and exhibited an encapsulation efficiency of 90%–95% (data not shown).

Evaluation of transfection efficiency

The translation efficiency of the different mRNAs was evaluated by luciferase assay for the detection of NanoLuc reporter protein and by ELISA for Spike protein.

Luciferase assay

Briefly, we removed the cell media and added the Hikarazine-108 NanoLuc substrate⁵⁵ diluted in PBS buffer at a final concentration of 4 μ M. Bioluminescence was then measured immediately using CLARIOstar plate reader (BMG Labtech). Relative Luciferase Units (RLUs) were normalized to protein content using BCA assay (Thermo) and expressed as RLU per mg of protein.

RBD ELISA

Briefly, the cells were harvested and lysed 24 h post-transfection, and spike protein expression was quantified using the Human SARS-CoV-2 RBD ELISA Kit (Thermo Fisher) according to the manufacturer's protocol.

Fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry analysis

We detected mRNA using the PrimeFlow RNA Assay Kit (Thermo Fisher) following manufacturer's protocol. We used Alexa-Fluor 488-labeled probes to detect GAPDH mRNA and Alexa Fluor 647-labeled probes to detect NanoLuc mRNA; probes were designed by Thermo Fisher scientific. Twenty thousand single-cell events were acquired for each sample on a BD FORTESSA X20 flow cytometer (Beckton Dickinson). Data were analyzed using BD FACSDiva Software

(Beckton Dickinson). NanoLuc probe signal was normalized to GAPDH probe signal.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from the samples using TRIzol reagent (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher), and the quality of the extraction was evaluated using an Agilent Bioanalyzer 2100. First-strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using the LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs).

The mRNA levels of NanoLuc, interferon alpha ($\text{IFN}\alpha/\beta$), tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$), and IL-6 were quantified at 2 and 24 h after transfection by real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) according to our previous report.⁵⁶ For NanoLuc, the primers anneal in the first third of the gene. qPCR was performed using the Luna qPCR Master Mix (New England Biolabs) with a LightCycler 480 PCR system (Roche). The qPCR data were analyzed by the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method, using the GAPDH RT-qPCR signal as an internal control for normalization. The primers used for RT-qPCR were synthesized by Eurogentec, and the sequences are listed in Table S4.

Polysome profiling

The translation status of different mRNAs was compared in HeLa cells using polysome profiling. One day prior to transfection, cells were seeded in 15 cm petri dishes at a density of 3×10^6 cells per dish. Transfection was performed using 10 μ g of IVT mRNA complexed with Lipofectamine (LFM). Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with 100 μ g/mL cycloheximide, then harvested and lysed following a method paper.⁵⁷

Approximately 350 μ L of cell lysate was loaded onto a 10%–50% sucrose gradient. After ultracentrifugation, the gradient was fractionated into 15 distinct fractions. RNA from each fraction was isolated using TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. A representative polysome profile is presented in Figure S11. The isolated RNA was then reverse transcribed to cDNA, and quantitative PCR (qPCR) was performed as described in the RT-qPCR section above.

In vivo evaluation

All animal procedures were approved by the French Ministry of Research (#30279 for intramuscular injection of luciferase mRNA, #44268 for immunization with Spike mRNA).

For luciferase expression, BALB/c mice ($n = 3$ to 7 per group) received intramuscular (i.m.) injections of 1 μ g N1-methyl-pseudouridine-modified firefly luciferase (Fluc) mRNA encapsulated in LNPs. Mice were imaged 5 min after intraperitoneal injection of 100 μ L of the D-luciferin substrate (15 mg/mL) (Promega) at 6, 24, 48, and 72 h post-injection of Fluc mRNA using an IVIS Lumina Imaging System (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). The

luciferase signal was quantified using Living Image software (PerkinElmer).

For the SARS-CoV-2 Spike immunization study, BALB/c mice ($n = 5$ per group) received 5 μg of N1-methyl-pseudouridine-modified Spike mRNA. LNPs were injected into the tibialis muscle on days 1 and 14. Blood was collected in Microvette 500 CAT-Gel tubes (Sarstedt) from the submandibular vein on days 0, 7, 13, and 21, then centrifuged to separate serum. Serum was stored at -80°C until assayed. Anti-Spike IgG antibodies were quantified using a mouse COVID-19 S IgG ELISA Kit (Antibodies.com). Neutralizing antibodies were quantified using an SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (GenScript).

Statistical analysis

Unless otherwise noted, results are expressed as mean $\pm$ SD or SEM. Data was analyzed using Graph Pad prism 8.0 software. Comparison of significance between groups was assessed using nested one-way ANOVA. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

DATA AVAILABILITY

The data underlying this article are available in the article and in its online [supplemental information](#).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yves Janin (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris) for Hikarazine NanoLuc substrate. We are grateful to Bertrand Castaing and Franck Coste for providing access to the Nano S zetasizer. We also thank Marilyne Le Mee and Stéphanie Retif, of the TAAM-In Vivo Imaging subplatforms of the MO2VING facility (Orléans, France). We are thankful to Clémence Couton who had shared her human blood sample expertise. The graphical abstract and schematics in [Figures 1, 3, 4, and 7](#) were created with BioRender.

Ayoub Medjmedj received a PhD fellowship from Région Center Val de Loire. This work was supported by Comités Régionaux de la Ligue Nationale contre le cancer (F.P. and J.H.), CNRS Prematuration grant RNAUTR (F.P.), and by Agence Nationale de la Recherche (CREABONE Grant Number ANR-21-CE18-0037). SRCD studies were supported by Synchrotron SOLEIL and were performed under proposal 20231392 (F.P.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M. and F.P. conceived the project and designed the experiments. A.M. performed most of the experiments. H.G. performed the bacterial tail stability and ELISA experiments. A.M., F.P., and A.N. performed plasmids cloning. J.H., F.W., F.P., and A.M. performed the SRCD experiments. C.C. performed polysomal sucrose gradient experiments. R.C. and C.G. participated in the animal experiments. D. H. and A.M. formulated and characterized the lipid nanoparticles (LNPs). A.B. established and provided the AB1079 cells. L.M. helped with MoDC. A.M. and F.P. analyzed the results, prepared the figures, and drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript and figures and approved the final version for submission.

DECLARATION OF INTERESTS

A.M., A.N., and F.P. are inventors of the patent WO2024231621 hold by CNRS related to the data in this work. Other authors declare no conflict of interest.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102648>.

REFERENCES

- Jackson, N.A.C., Kester, K.E., Casimiro, D., Gurunathan, S., and DeRosa, F. (2020). The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines* 5, 11. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>.
- Barbier, A.J., Jiang, A.Y., Zhang, P., Wooster, R., and Anderson, D.G. (2022). The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. *Nat. Biotechnol.* 40, 840–854. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01294-2>.
- Lenk, R., Kleindienst, W., Szabó, G.T., Baiersdörfer, M., Boros, G., Keller, J.M., Mahiny, A.J., and Vlatkovic, I. (2024). Understanding the impact of in vitro transcription byproducts and contaminants. *Front. Mol. Biosci.* 11, 1426129. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1426129>.
- Kang, D.D., Li, H., and Dong, Y. (2023). Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 199, 114961. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114961>.
- Hinnebusch, A.G., Ivanov, I.P., and Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 352, 1413–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- Mayr, C. (2019). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 11, a034728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>.
- Zeng, C., Hou, X., Yan, J., Zhang, C., Li, W., Zhao, W., Du, S., and Dong, Y. (2020). Leveraging mRNA Sequences and Nanoparticles to Deliver SARS-CoV-2 Antigens In Vivo. *Adv. Mater.* 32, e2004452. <https://doi.org/10.1002/adma.202004452>.
- Cao, J., Novoa, E.M., Zhang, Z., Chen, W.C.W., Liu, D., Choi, G.C.G., Wong, A.S.L., Wehrspaun, C., Kellis, M., and Lu, T.K. (2021). High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nat. Commun.* 12, 4138. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24436-7>.
- Castillo-Hair, S., Fedak, S., Wang, B., Linder, J., Havens, K., Certo, M., and Seelig, G. (2024). Optimizing 5'UTRs for mRNA-delivered gene editing using deep learning. *Nat. Commun.* 15, 5284. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49508-2>.
- Sample, P.J., Wang, B., Reid, D.W., Presnyak, V., McFadyen, I.J., Morris, D.R., and Seelig, G. (2019). Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nat. Biotechnol.* 37, 803–809. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0164-5>.
- Orlandini von Niessen, A.G., Poleganov, M.A., Rechner, C., Plaschke, A., Kranz, L. M., Fesser, S., Diken, M., Löwer, M., Vallazza, B., Beissert, T., et al. (2019). Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol. Ther.* 27, 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2018.12.011>.
- Xia, X. (2021). Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Vaccines* 9, 734. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070734>.
- Imai, S., Kumar, P., Hellen, C.U.T., D'Souza, V.M., and Wagner, G. (2016). An accurately preorganized IRES RNA structure enables eIF4G capture for initiation of viral translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 859–864. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3280>.
- Goldstrohm, A.C., and Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 337–344. <https://doi.org/10.1038/nrm2370>.
- Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D.A., and Jacobson, A. (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453, 1276–1280. <https://doi.org/10.1038/nature06974>.
- Grier, A.E., Burleigh, S., Sahni, J., Clough, C.A., Cardot, V., Choe, D.C., Krutein, M. C., Rawlings, D.J., Jensen, M.C., Scharenberg, A.M., and Jacoby, K. (2016). pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly (A) Sequences. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 5, e306. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.21>.
- EBERLE, F., Sahin, U., Kuhn, A., Vallazza, B., and Diken, M. (2016). Stabilization of poly(a) sequence encoding dna sequences. *US10717982B2* 2020-07-21.
- Chen, H., Liu, D., Guo, J., Aditham, A., Zhou, Y., Tian, J., Luo, S., Ren, J., Hsu, A., Huang, J., et al. (2025). Branched chemically modified poly(A) tails enhance the

- translation capacity of mRNA. *Nat. Biotechnol.* 43, 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02174-7>.
20. Lim, J., Kim, D., Lee, Y.S., Ha, M., Lee, M., Yeo, J., Chang, H., Song, J., Ahn, K., and Kim, V.N. (2018). Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science* 361, 701–704. <https://doi.org/10.1126/science.aam5794>.
 21. Chang, H., Lim, J., Ha, M., and Kim, V.N. (2014). TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications. *Mol. Cell* 53, 1044–1052. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.007>.
 22. Liu, Y., Nie, H., Sun, R., Wang, J., and Lu, F. (2021). Enhancement of synthetic mRNA translation efficiency through engineered poly(A) tails. Preprint at bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.08.30.458298>.
 23. Sosnick, T.R. (2001). Characterization of Tertiary Folding of RNA by Circular Dichroism and Urea. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. Chapter 11*, Unit 11.5. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1105s04>.
 24. Kloczewiak, M., Banks, J.M., Jin, L., and Brader, M.L. (2022). A Biopharmaceutical Perspective on Higher-Order Structure and Thermal Stability of mRNA Vaccines. *Mol. Pharm.* 19, 2022–2031. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00092>.
 25. Wien, F., Geinguenaud, F., Grange, W., and Arluison, V. (2021). SRCD and FTIR Spectroscopies to Monitor Protein-Induced Nucleic Acid Remodeling. In *RNA Remodeling Proteins: Methods and Protocols*, M. Boudvillain, ed. (Springer US), pp. 87–108. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0935-4_6.
 26. Vivinus, S., Baulande, S., van Zanten, M., Campbell, F., Topley, P., Ellis, J.H., Dessen, P., and Coste, H. (2001). An element within the 5' untranslated region of human Hsp70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *Eur. J. Biochem.* 268, 1908–1917. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02064.x>.
 27. Linares-Fernández, S., Moreno, J., Lambert, E., Mercier-Gouy, P., Vachez, L., Verrier, B., and Exposito, J.-Y. (2021). Combining an optimized mRNA template with a double purification process allows strong expression of in vitro transcribed mRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 26, 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.10.007>.
 28. Licursi, M., Christian, S.L., Pognonparat, T., and Hirasawa, K. (2011). In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression. *Gene Ther.* 18, 631–636. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.11>.
 29. Gross, L., Vicens, Q., Einhorn, E., Noireterre, A., Schaeffer, L., Kuhn, L., Imler, J.-L., Eriani, G., Meignin, C., and Martin, F. (2017). The IRES'5'UTR of the dicistrovirus cricket paralysis virus is a type III IRES containing an essential pseudoknot structure. *Nucleic Acids Res.* 45, 8993–9004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx622>.
 30. Godet, A.-C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., and Prats, A.-C. (2019). IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 924. <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>.
 31. Rubtsova, M.P., Sizova, D.V., Dmitriev, S.E., Ivanov, D.S., Prassolov, V.S., and Shatsky, I.N. (2003). Distinctive Properties of the 5'-Untranslated Region of Human Hsp70 mRNA. *J. Biol. Chem.* 278, 22350–22356. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303213200>.
 32. Yang, A.-D., Barro, M., Gorziglia, M.I., and Patton, J.T. (2004). Translation enhancer in the 3'-untranslated region of rotavirus gene 6 mRNA promotes expression of the major capsid protein VP6. *Arch. Virol.* 149, 303–321. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0211-9>.
 33. Chung, D.J., Wright, A.E., and Clerch, L.B. (1998). The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* 37, 16298–16306. <https://doi.org/10.1021/bi980935g>.
 34. Kuhn, A.N., Diken, M., Kreiter, S., Vallazza, B., Türeci, Ö., and Sahin, U. (2011). Determinants of intracellular RNA pharmacokinetics: Implications for RNA-based immunotherapeutics. *RNA Biol.* 8, 35–43. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.13767>.
 35. Uchida, S., Perche, F., Pichon, C., and Cabral, H. (2020). Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery. *Mol. Pharm.* 17, 3654–3684. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618>.
 36. Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Adyanova, Z.V., Terenin, I.M., and Shatsky, I.N. (2009). Efficient cap-dependent translation of mammalian mRNAs with long and highly structured 5'-untranslated regions in vitro and in vivo. *Mol. Biol.* 43, 108–113. <https://doi.org/10.1134/S0026893309010154>.
 37. Warminski, M., Mamot, A., Depaix, A., Kowalska, J., and Jemielity, J. (2023). Chemical Modifications of mRNA Ends for Therapeutic Applications. *Acc. Chem. Res.* 56, 2814–2826. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00442>.
 38. Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E., Vogler, I., Kranz, L.M., Vormehr, M., Baum, A., Pascal, K., Quandt, J., Maurus, D., et al. (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 586, 594–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>.
 39. Svitkin, Y.V., Cheng, Y.M., Chakraborty, T., Presnyak, V., John, M., and Sonenberg, N. (2017). N1-methyl-pseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acids Res.* 45, 6023–6036. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx135>.
 40. Arrigucci, R., Bushkin, Y., Radford, F., Lakehal, K., Vir, P., Pine, R., Martin, D., Sugarman, J., Zhao, Y., Yap, G.S., et al. (2017). FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 12, 1245–1260. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.039>.
 41. Lee, Y.S., Leviansky, Y., Jung, Y., Kim, V.N., and Valkov, E. (2024). Deadenylation kinetics of mixed poly(A) tails at single-nucleotide resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 31, 826–834. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01187-1>.
 42. Weingarten-Gabbay, S., Elias-Kirma, S., Nir, R., Gritsenko, A.A., Stern-Ginossar, N., Yakhini, Z., Weinberger, A., and Segal, E. (2016). Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* 351, aad4939. <https://doi.org/10.1126/science.aad4939>.
 43. Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2016). IRES unplugged. *Science* 351, 228. <https://doi.org/10.1126/science.aad8540>.
 44. Kirshina, A., Vasileva, O., Kunyk, D., Seregina, K., Muslimov, A., Ivanov, R., and Reshetnikov, V. (2023). Effects of Combinations of Untranslated-Region Sequences on Translation of mRNA. *Biomolecules* 13, 1677. <https://doi.org/10.3390/biom13111677>.
 45. Bicknell, A.A., Reid, D.W., Licata, M.C., Jones, A.K., Cheng, Y.M., Li, M., Hsiao, C.J., Pepin, C.S., Metkar, M., Leviansky, Y., et al. (2024). Attenuating ribosome load improves protein output from mRNA by limiting translation-dependent mRNA decay. *Cell Rep.* 43, 114098. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114098>.
 46. Lewis, C.J.T., Xie, L.H., Bhandarkar, S.M., Jin, D., Abdallah, K., Draycott, A.S., Chen, Y., Thoreen, C.C., and Gilbert, W.V. (2025). Quantitative profiling of human translation initiation reveals elements that potently regulate endogenous and therapeutically modified mRNAs. *Mol. Cell* 85, 445–459.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.11.030>.
 47. Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Mol. Cell* 21, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>.
 48. Burman, L.G., and Mauro, V.P. (2012). Analysis of rRNA processing and translation in mammalian cells using a synthetic 18S rRNA expression system. *Nucleic Acids Res.* 40, 8085–8098. <https://doi.org/10.1093/nar/gks530>.
 49. Hall, M.P., Unch, J., Binkowski, B.F., Valley, M.P., Butler, B.L., Wood, M.G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., et al. (2012). Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>.
 50. Mathur, L., Jung, S., Jang, C., and Lee, G. (2021). Quantitative analysis of m6A RNA modification by LC-MS. *STAR Protoc.* 2, 100724. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100724>.
 51. Miles, A.J., and Wallace, B.A. (2018). CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. *Protein Sci.* 27, 1717–1722. <https://doi.org/10.1002/pro.3474>.
 52. Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet. Muscle* 1, 34. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-34>.
 53. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723–2730.
 54. Medjmedj, A., Ngalle-Loth, A., Clemençon, R., Hamacek, J., Pichon, C., and Perche, F. (2022). Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol,

- Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA. *Nanomater. Basel Switz.* 12, 2446. <https://doi.org/10.3390/nano12142446>.
55. Coutant, E.P., Goyard, S., Hervin, V., Gagnot, G., Baatallah, R., Jacob, Y., Rose, T., and Janin, Y.L. (2019). Gram-scale synthesis of luciferins derived from coelenterazine and original insights into their bioluminescence properties. *Org. Biomol. Chem.* 17, 3709–3713. <https://doi.org/10.1039/C9OB00459A>.
56. Wang, P., Perche, F., Midoux, P., Cabral, C.S.D., Malard, V., Correia, I.J., Ei-Hafci, H., Petite, H., Logeart-Avramoglou, D., and Pichon, C. (2021). In Vivo bone tissue induction by freeze-dried collagen-nanohydroxyapatite matrix loaded with BMP2/NS1 mRNAs lipopolyplexes. *J. Contr. Release* 334, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.04.021>.
57. Morita, M., Alain, T., Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2013). Polysome Profiling Analysis. *Bio. Protoc.* 3. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.833>.

Supplemental information

Evaluation of synthetic mRNA with selected UTR sequences and alternative poly(A) tail, *in vitro* and *in vivo*

Ayoub Medjmedj, Hugo Genon, Dounia Hezili, Albert Ngalle Loth, Rudy Clemençon, Cyril Guimpied, Lucile Mollet, Anne Bigot, Frank Wien, Josef Hamacek, Clément Chapat, and Federico Perche

Table S1: sequences of the poly(A) tails evaluated.

Name	Sequence
A120	AA AA
A30L70	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA
A/G	AAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAA AAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAGAA AAAAAAAAAAG

Table S2: dsRNA levels of different IVT mRNA: All mRNAs are capped with ARCA, except for the Oz Bioscience mRNA, which is cap1.

5'UTR	CDS	3'UTR	dsRNA % $\pm$ SD
hAg	Nano luciferase	AES	0.361 $\pm$ 0.144
		VP6	0.510 $\pm$ 0.219
		SOD	0.280 $\pm$ 0.013
UTR3		AES	0.294 $\pm$ 0.072
		VP6	0.233 $\pm$ 0.020
		SOD	0.209 $\pm$ 0.011
UTR4		AES	0.331 $\pm$ 0.147
		VP6	0.291 $\pm$ 0.079
		SOD	0.206 $\pm$ 0.008
hAg	Firefly luciferase	AES	0.431 $\pm$ 0.117
		VP6	0.379 $\pm$ 0.184
		SOD	0.259 $\pm$ 0.025
UTR3		AES	0.239 $\pm$ 0.003
		VP6	0.293 $\pm$ 0.014
		SOD	0.302 $\pm$ 0.105
UTR4		AES	0.263 $\pm$ 0.028
		VP6	0.407 $\pm$ 0.095
		SOD	0.276 $\pm$ 0.006
Firefly luciferase Oz Bioscience			0.196 $\pm$ 0.036
hAg	Spike	AES	0.175 $\pm$ 0.018
		VP6	0.163 $\pm$ 0.024
		SOD	0.142 $\pm$ 0.004

Table S3: dsRNA level of IVT mRNA using different cap, U or m1Ψ, and before/after oligo dT purification.

		dsRNA % ± SD	
Cap	Nucleotides	Without Oligo dT purification	With Oligo dT purification
None	U	0.365 ± 0.063	0.154 ± 0.008
	m1Ψ	0.288 ± 0.115	0.129 ± 0.013
ARCA	U	0.947 ± 0.112	0.552 ± 0.144
	m1Ψ	0.112 ± 0.004	0.118 ± 0.013
CleanCap AG	U	0.544 ± 0.089	0.247 ± 0.015
	m1Ψ	0.105 ± 0.004	0.140 ± 0.014

Table S4: qPCR primers

Sequences (5' -> 3')		
	FW	RV
IFN-α	AAGCCATCCTTGCTAAGAGA	AGCAAGTTGGTTGAGGAAGAGA
IFN-β	AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
TNF-α	ATGAGCACAGAAAGCATGA	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
Nluc	GGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAG	CACAGGGTACCCACCTTAA
GAPDH	GCTGCGTTTTACACCCTTTC	GTTTGCTCCACCCAACTGC

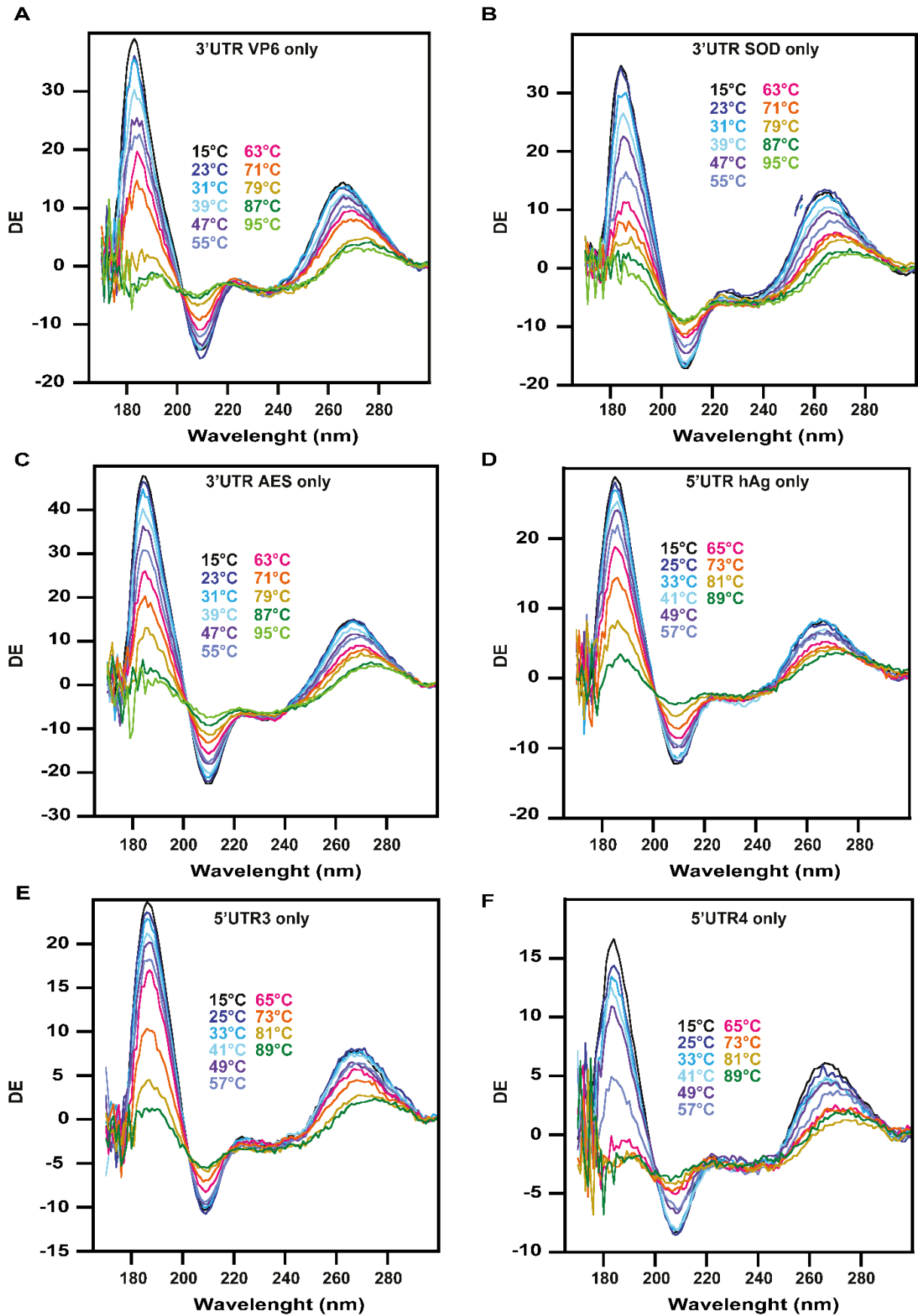


Figure S1: Synchrotron Radiation Circular Dichroism analysis of UTR sequences. (A) 3'UTR VP6, (B) 3'UTR SOD, (C) 3'UTR AES, (D) 5'UTR hAg, (E) 5'UTR3, (F) 5'UTR4. DE: Delta Epsilon

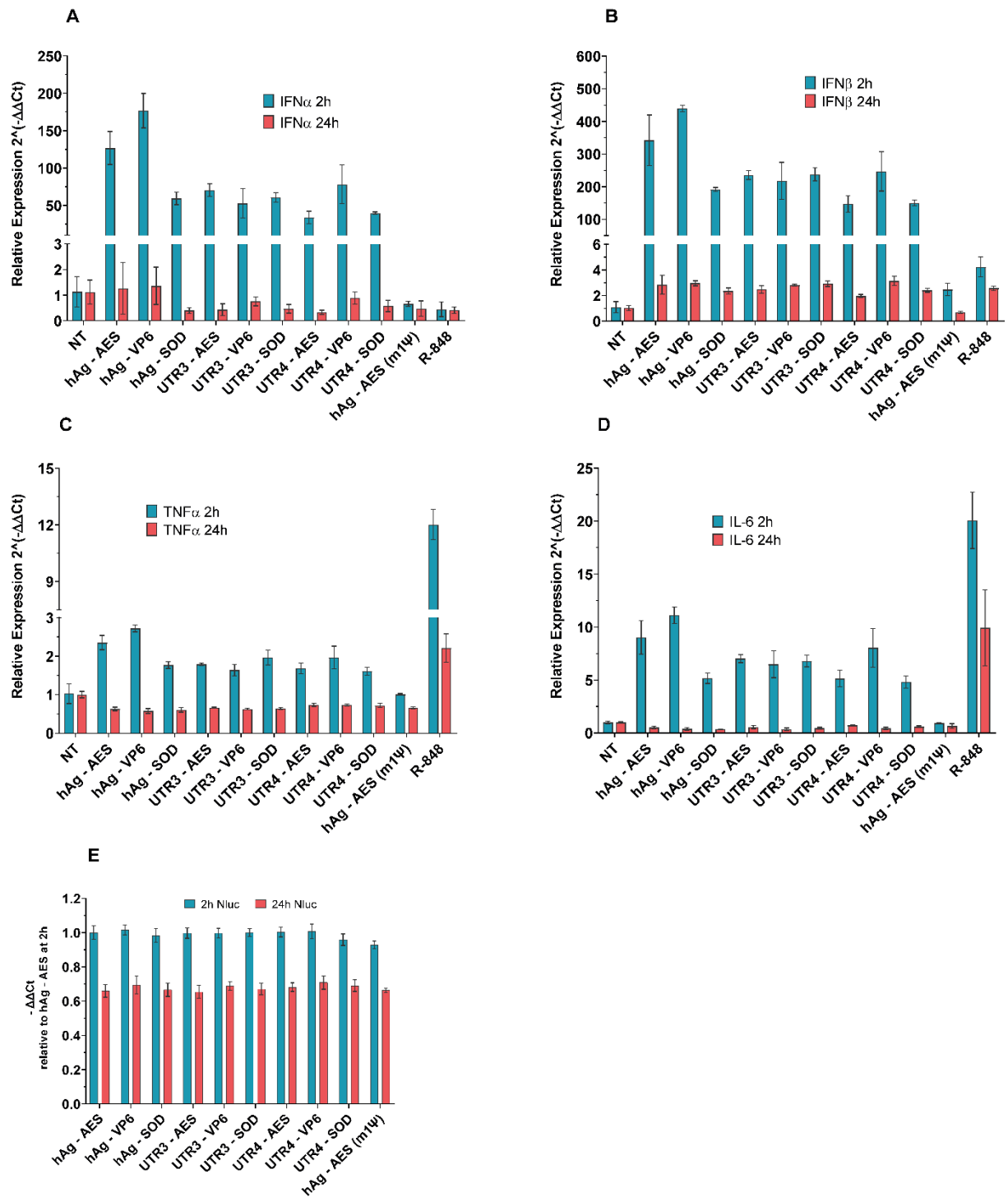


Figure S2: qPCR results of the immunogenicity of the IVT mRNA in DC 2.4 after transfection. Results show moderate and transient activation of the interferon pathway at 2h post transfection before returning to basal levels at 24h post transfection.

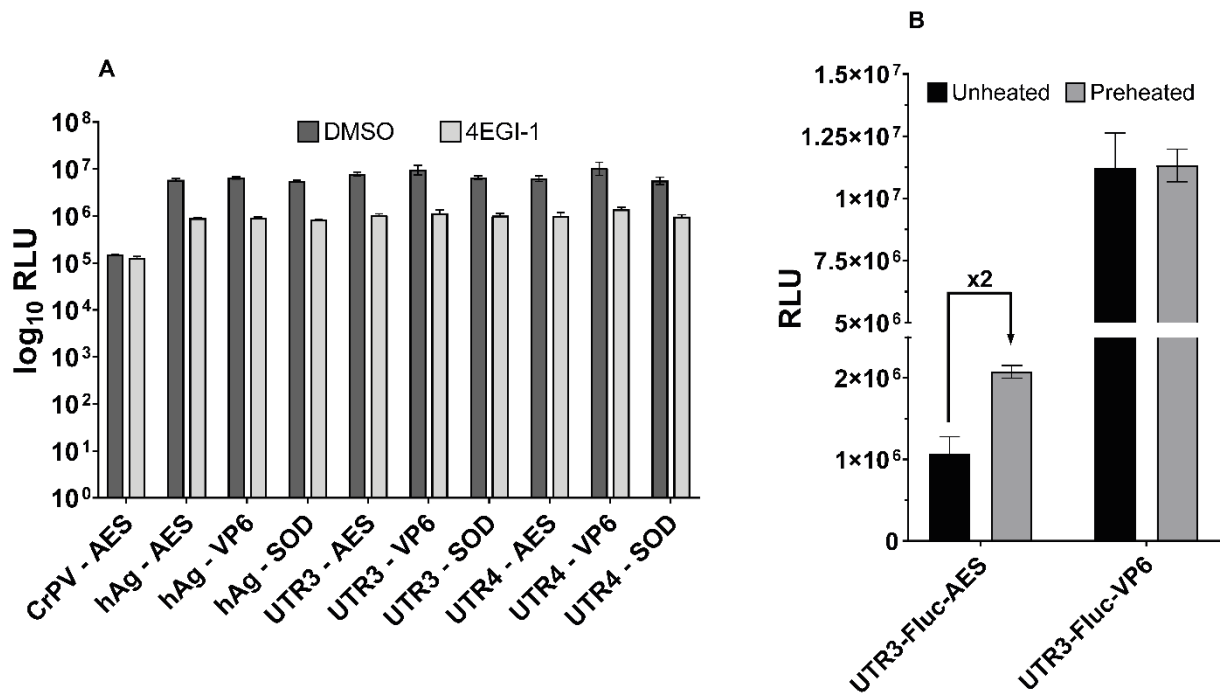


Figure S3: *In vitro* translation in the rabbit reticulocytes lysate (RRL): A) Nano luciferase B) Firefly luciferase

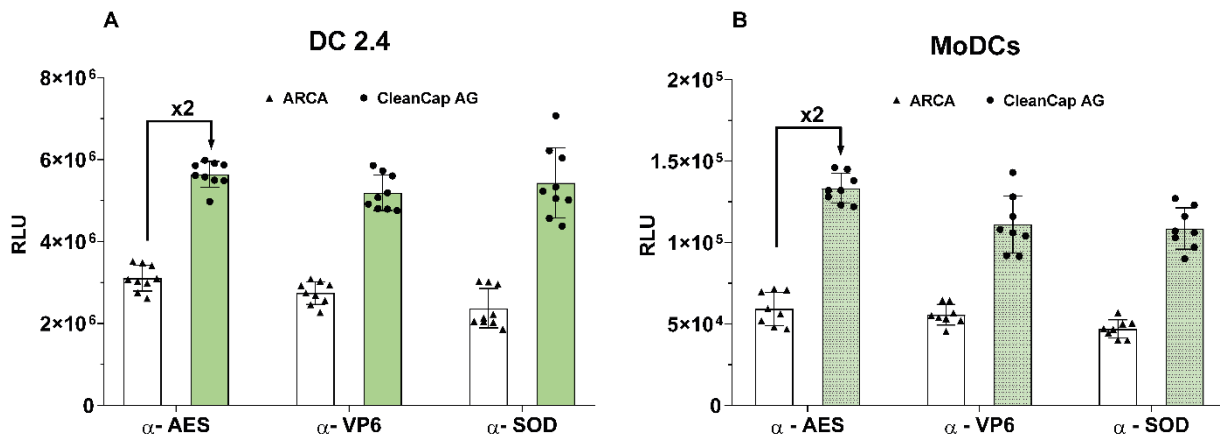


Figure S4: ARCA-capped mRNA compared to CleanCap AG-capped mRNA in DC 2.4 cells and MoDCs primary cells

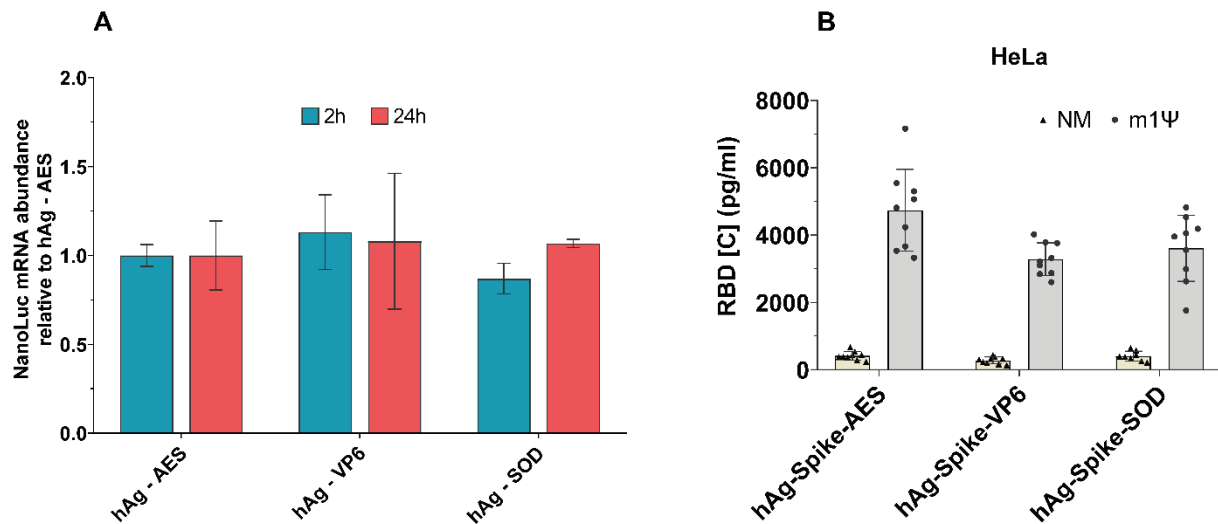


Figure S5: A) FISH-Flow results of Nano luciferase mRNA, B) non modified spike mRNA compared to m1Ψ spike mRNA in HeLa cells 24 hours after transfection.

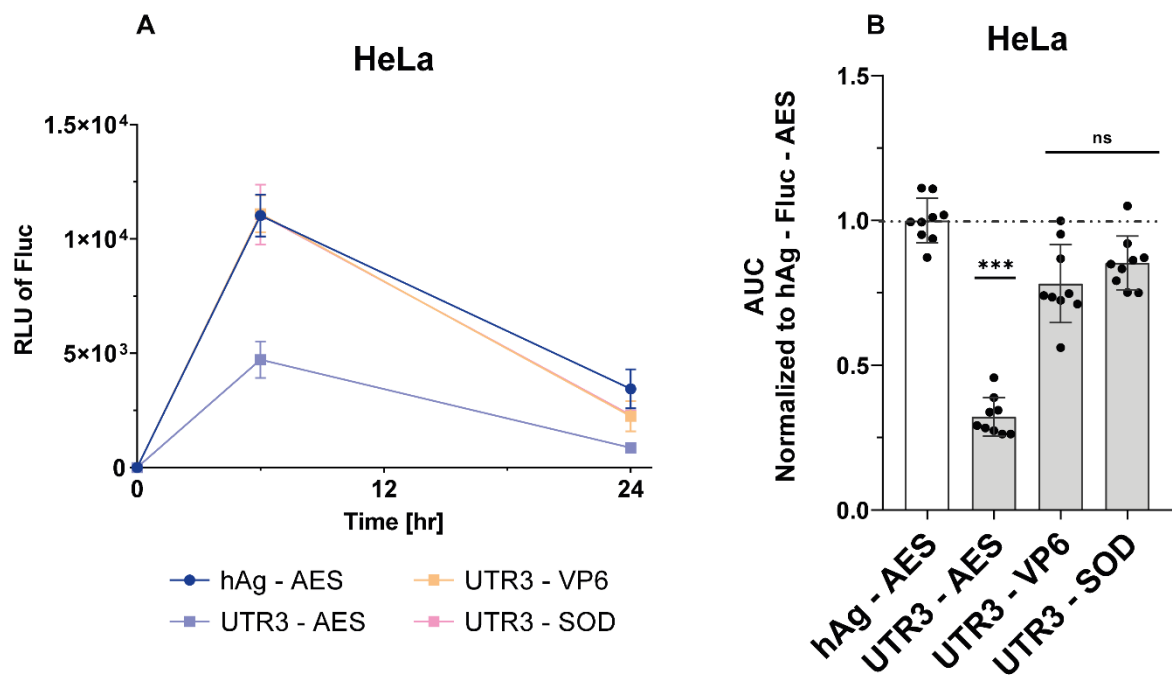


Figure S6: Evaluation of 5'UTR3 combinations in HeLa cells: (A) Time course analysis of Fluc expression in HeLa cells transfected with the three mRNA constructs and the benchmark mRNA. Bioluminescence was acquired at 6, and 24h post-transfection, and results are expressed as mean $\pm$ SD. (B) Total protein expression over time (area under the curve) calculated from time course data and normalized to the hAg 5'UTR-AES 3'UTR.

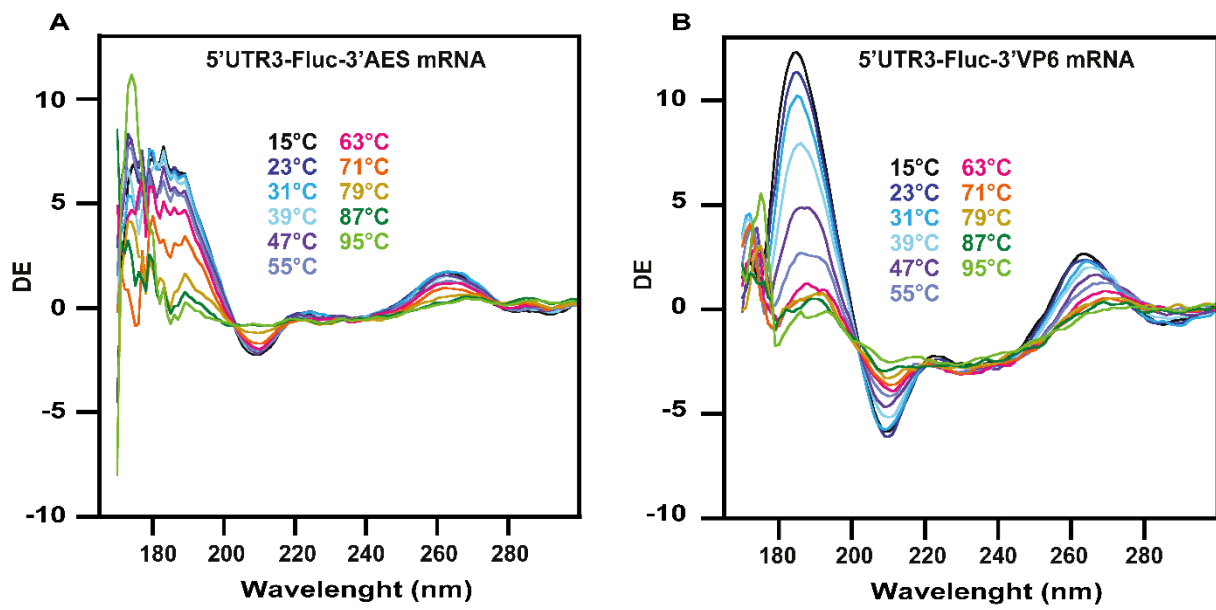


Figure S7: Synchrotron Radiation Circular Dichroism analysis of (A) 5'UTR3-Fluc-3'AES mRNA and (B) 5'UTR3-Fluc-3'VP6 mRNA. DE: Delta Epsilon

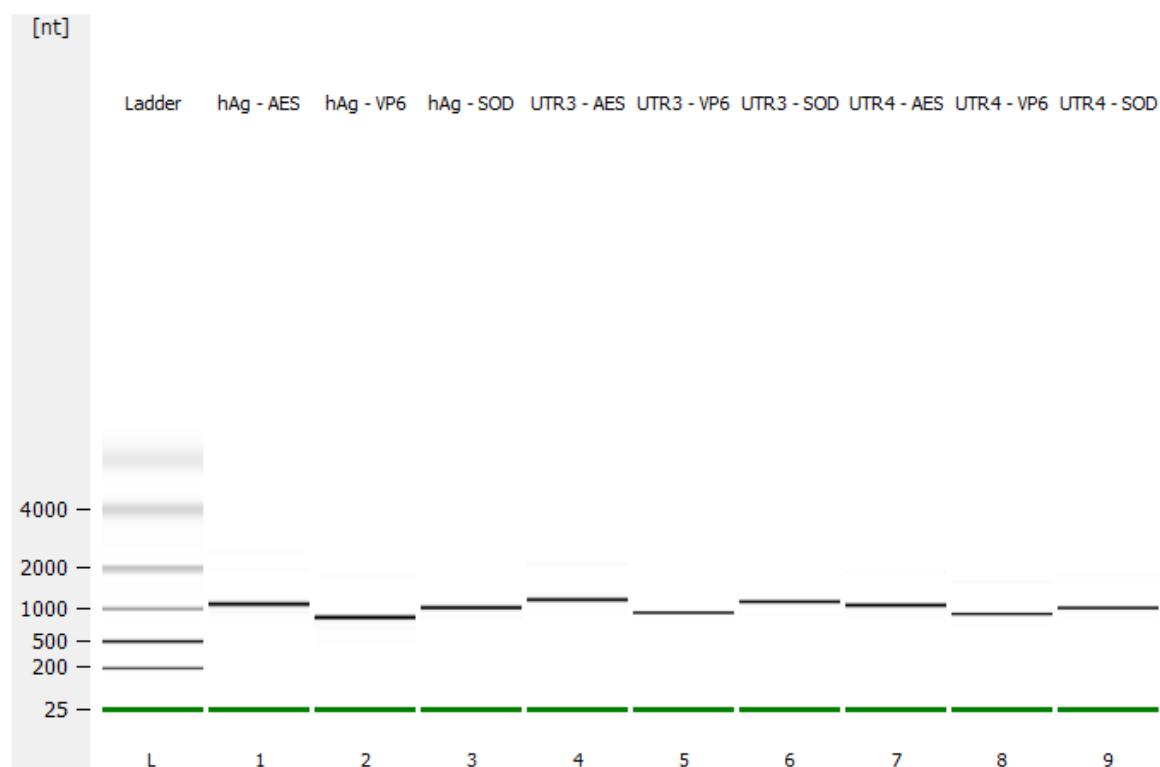


Figure S8: Agilent gel of IVT ARCA Nano luciferase mRNA. We confirm the good quality of our mRNAs.

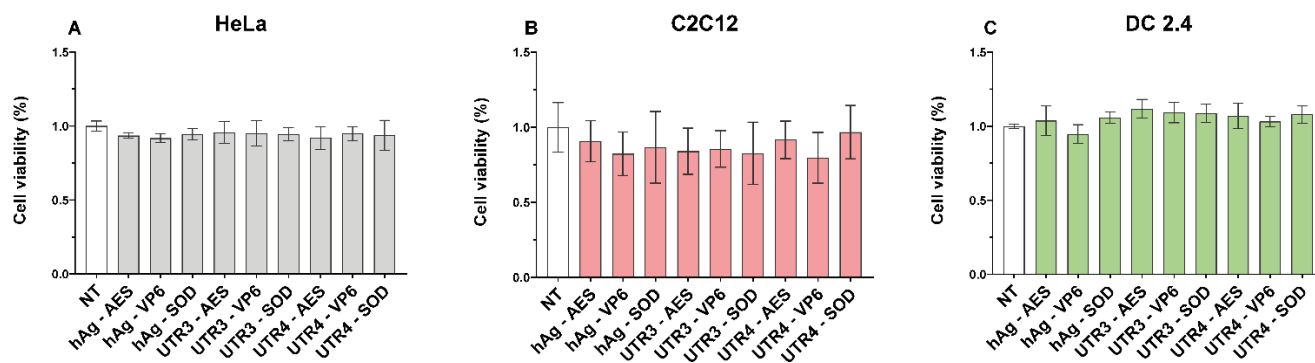


Figure S9: Cell viability 24 hours after transfection with Lipofectamine MessengerMAX complexes as determined by the MTT assay.

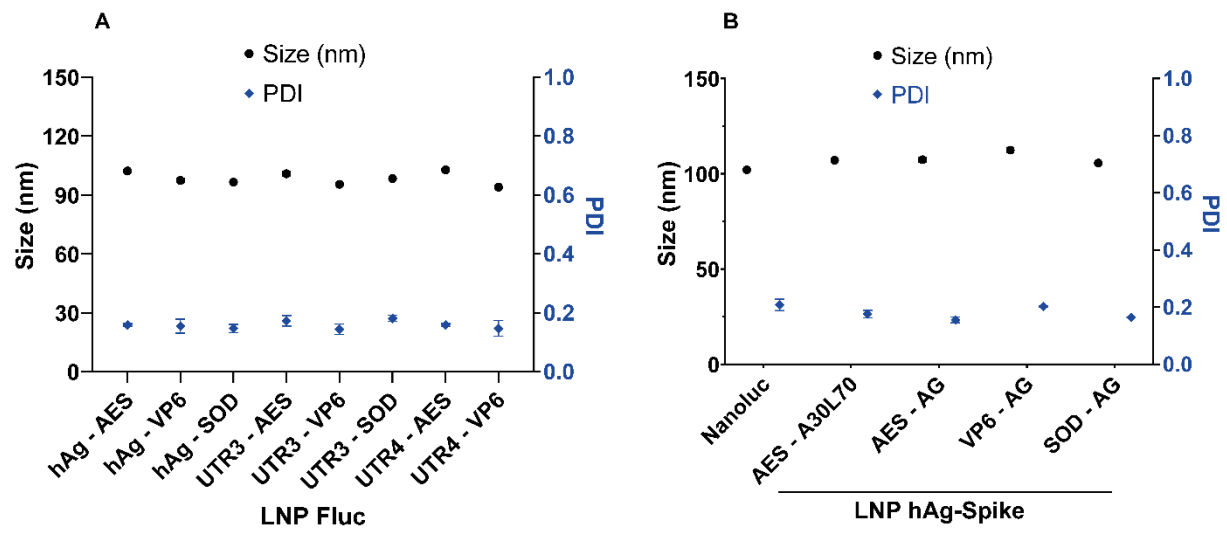


Figure S10: LNP characterization: A) Fluc LNP, B) Spike LNP.

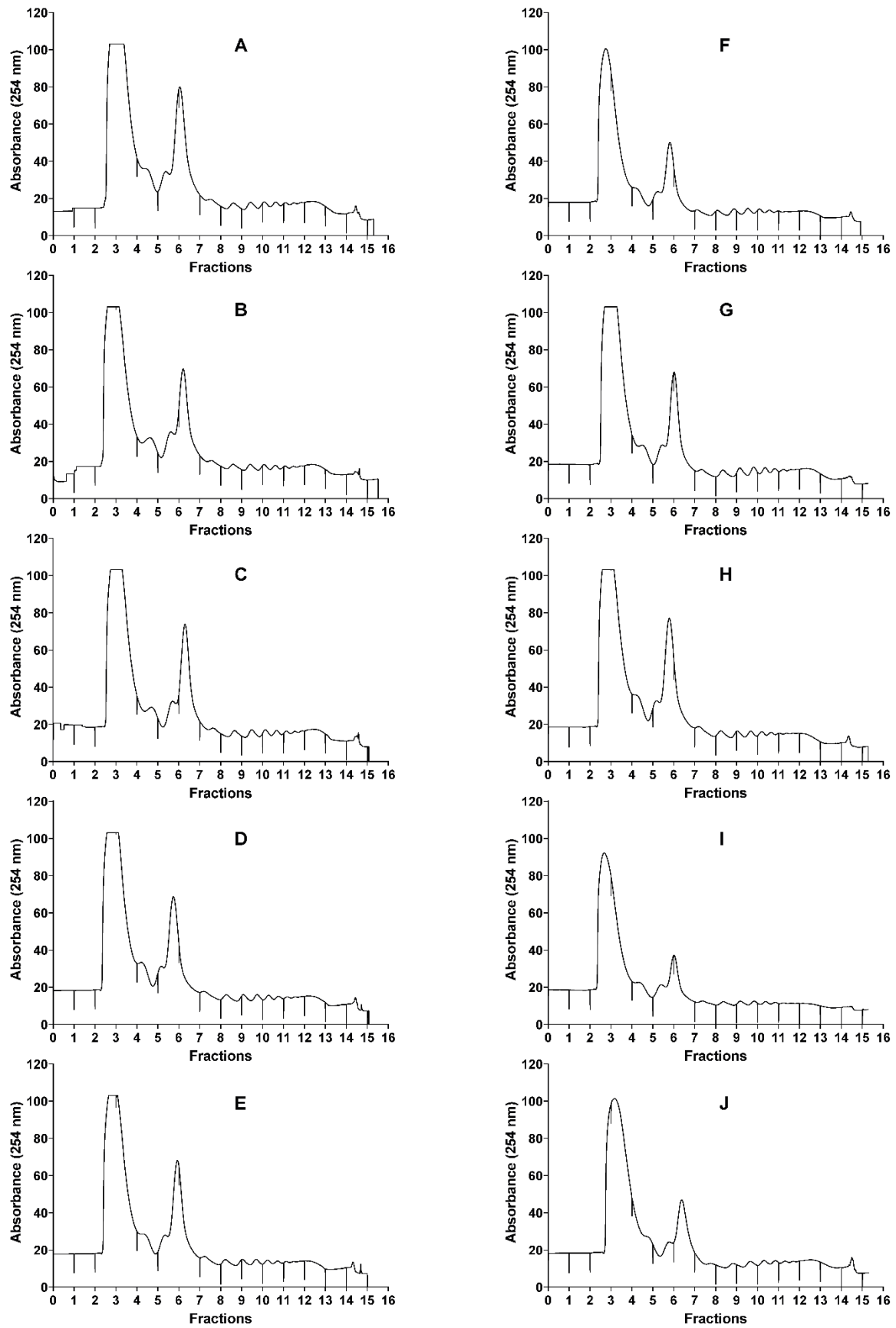


Figure S11: Polysomes Profiles 24h after transfection: A) NT, B) hAg-AES, C) hAg-VP6, D) hAg-SOD, E) UTR3-AES, F) UTR3-VP6, G) UTR3-SOD, H) UTR4-AES, I) UTR4-VP6, J) UTR4-SOD

Discussion générale

Les thérapies à base d'ARNm attirent de plus en plus l'attention de la communauté scientifique et des investisseurs, notamment après le succès extraordinaire des deux vaccins à ARNm approuvés en 2020 pour lutter contre le SARS-CoV-2. Plusieurs études sont en cours d'essai clinique pour diverses applications (pour revue (Žak & Zangi, 2025)), et récemment, en 2024, la FDA et la Commission européenne ont approuvé la mise sur le marché du vaccin à ARNm contre le virus respiratoire syncytial (VRS), le mRESVIA® de Moderna.

Cette technologie repose sur deux éléments : l'ARN messenger et les systèmes de délivrance lipidique. L'optimisation de chacun de ces éléments est cruciale pour rendre cette technologie de plus en plus robuste et efficace. Des avancées majeures ont déjà été réalisées dans l'ingénierie des séquences d'ARNm, la synthèse de nouveaux composants lipidiques et l'amélioration du processus de formulation.

Malgré ces avancées, plusieurs défis persistent, notamment dans le traitement des maladies chroniques, où l'administration répétée de complexes ARNm-LNP immunogènes pourrait se révéler contre-productive. S'y ajoutent la faible stabilité des formulations ARNm-LNP lors du stockage et la nécessité d'optimiser l'efficacité de l'échappement endosomal.

Dans le cadre de la continuité de l'optimisation de la technologie à base d'ARNm, mes travaux de thèse visent à optimiser les vecteurs lipidiques, plus précisément les LNPs, ainsi que l'ingénierie de séquence de l'ARNm synthétique, en modifiant les UTR et la queue poly(A).

La première partie était consacrée aux nanoparticules lipidiques (Medjmedj et al., 2022)

Nous avons étudié les effets de différents lipides helpers sur l'efficacité de la transfection *in cellulo* et *in vivo*, ainsi que sur leur trafic intracellulaire. Nous avons comparé trois formulations de LNP différentes par leurs lipides helpers (DSPC/cholestérol (référence), DOPE/cholestérol et DOPE/ β -sitostérol) en utilisant des ARNm codant pour des protéines rapporteurs, à savoir la protéine EGFP et la firefly

luciférase. Notre étude a démontré que les LNPs à base de DOPE présentait de meilleures performances que ceux à base de DSPC, ce qui est en accord avec les données observées dans la littérature (R. Zhang et al., 2021; Álvarez-Benedicto et al., 2022). Nous avons également constaté que la formulation LNP à base de DOPE/ β -sitostérol était la plus efficace des trois formulations testées *in vivo*.

Les résultats de l'étude du trafic intracellulaire combinés à l'efficacité de la transfection ont montré que l'accumulation des LNPs dans les endosomes de recyclage Rab11-positifs, était inversement proportionnelle à l'efficacité de la transfection. Cette observation suggère que les faibles performances du LNP-DSPC/Chol par rapport au LNP-DOPE seraient liées à leur plus forte expulsion des cellules après transfection. L'efficacité des LNPs à base de β -sitostérol a été démontrée par le groupe de Sahay comme étant indépendante du type cellulaire et du lipide ionisable utilisé, en utilisant le DSPC comme phospholipide helper (S. Patel et al., 2020b). Dans notre étude, la formulation LNP DOPE/ β -sitostérol était la meilleure *in vivo*, mais pas *in vitro* (Medjmedj et al., 2022). Je pense qu'il aurait fallu comparer côte à côte DSPC/ β -sitostérol et DOPE/ β -sitostérol pour en savoir plus sur le rôle du β -sitostérol dans l'amélioration des performances des LNPs. Si nous avions ajouté la formulation DSPC/ β -sitostérol comme contrôle dans notre étude, nous aurions pu répondre à la question de savoir pourquoi nous n'avions pas obtenu les mêmes résultats que le groupe de Sahay.

La différence observée est-elle liée à la présence de DOPE à la place de DSPC, ou à des différences plus techniques dans la façon et les paramètres de formulation des LNPs ?

En ce qui concerne le trafic intracellulaire des LNPs DOPE/Chol et DOPE/ β -sitostérol, on constate qu'il n'y a aucune différence 4 h après la transfection, que ce soit au niveau de l'internalisation cellulaire des complexes ARNm-LNP ou de leur distribution dans les différents endosomes (précoce, tardif et de recyclage), ce qui est cohérent avec l'étude de Patel et coll. (S. Patel et al., 2020b) dans laquelle ils ont observé une similarité de distribution entre les LNPs DSPC/Chol et DSPC/ β -sitostérol dans les endosomes 4h après la transfection. Cependant, au fil du temps, ils ont observé une rétention des LNPs à base de β -sitostérol dans les compartiments vésiculaires, ce qui conduit probablement à une augmentation de l'efficacité de l'échappement endosomal par rapport aux LNPs à base de cholestérol (S. Patel et al., 2020b). Bien que les lipides auxiliaires, à savoir les phospholipides et les stérols, puissent jouer un rôle dans l'amélioration de l'échappement

endosomal, c'est le cas du bêta-sitostérol (S. Patel et al., 2020b) et du DOPE (Álvarez-Benedicto et al., 2022). Le lipide ionisable reste l'élément clé pour une amélioration conséquente.

À mon avis, trois axes principaux peuvent encore booster la technologie des LNPs : l'amélioration de l'échappement endosomal, l'amélioration du stockage des complexes après formulation et le ciblage sélectif.

Concernant l'amélioration de l'échappement endosomal des LNPs, de nombreux groupes de recherche s'intéressent à la modification ou au développement de nouveaux lipides ionisables pour améliorer la libération efficace de l'ARNm dans le cytosol des cellules (voir la revue de littérature (Lu et al., 2024)). Le groupe d'Akita, au Japon, a notamment mis au point une série de lipides ionisables autodégradables appelés « ssPalm », qui comprennent une liaison S-S clivable et une structure lipidique activée par le pH. Pour améliorer l'échappement endosomal, ils ont modifié la structure des groupes hydrophiles de la tête du lipide ionisable en passant d'amines tertiaires linéaires à des cycles pipérazine (ssPalmO-Paz4-C2), ce qui a entraîné une augmentation de plus de dix fois du signal de la luciférase dans le côlon (Tanaka et al., 2018). Dans l'équipe de Michael J. Mitchell, à l'université de Pennsylvanie, une plateforme a été développée pour synthétiser une classe de lipides ionisables appelée BEND (Branched endosomal disruptor). En résumé, ils ont démontré que ces lipides ionisables BEND pouvaient améliorer la transfection médiée par les LNPs pour la délivrance d'ARNm et de protéines dans le foie. De plus, lorsqu'elles sont appliquées à l'édition génétique et à la délivrance de cellules T, les LNPs BEND ont montré une amélioration de l'édition hépatique avec l'ARNm Cas9 et le complexe Cas9 RNP, ainsi qu'une transfection totale des cellules T (Padilla et al., 2025). J'ai évoqué ces deux études à titre d'exemples, mais il existe plusieurs autres études. Les efforts sont intensifiés par les différentes équipes de recherche dans le monde entier pour pallier la limite de l'échappement endosomal.

Le ciblage sélectif représente un défi majeur pour la technologie des LNPs, en particulier pour les applications thérapeutiques extra-hépatiques. Les recherches se concentrent le plus souvent sur le ciblage actif en ajoutant des ligands pour des récepteurs spécifiques. Ces ligands sont généralement conjugués à des lipides PEG (figure 18), mais peuvent également être conjugués à d'autres composants lipidiques, tels que les lipides ionisables (Lin et al., 2023).

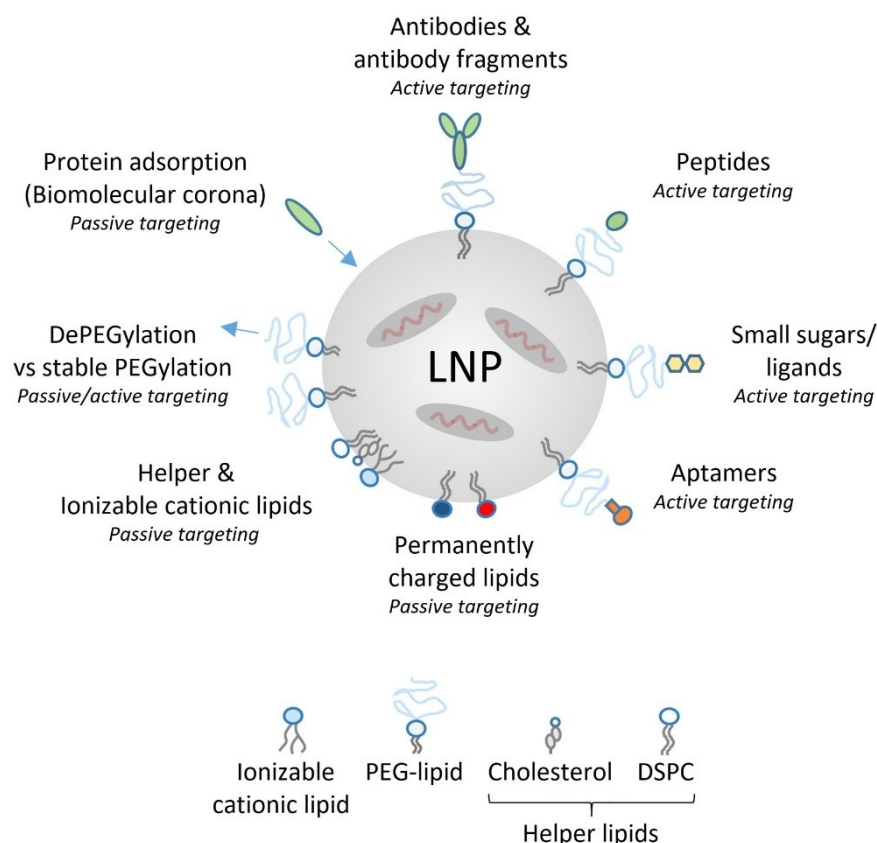


Figure 18 : Différentes stratégies pour diriger les LNPs vers des tissus/types cellulaires spécifiques : Les quatre types de lipides utilisés dans les produits cliniques actuels à base de LNP sont en bas de la figure (Simonsen, 2024).

La revue de Simonsen examine les défis potentiels liés aux stratégies de ciblage actuelles des LNPs (Simonsen, 2024). À la différence des paradigmes actuels, les résultats de Su *et al.*, montrent que le cholestérol et les phospholipides ne sont pas indispensables au bon fonctionnement des LNPs. Plus précisément, l'élimination du cholestérol de la formulation LNP permet de réduire l'accumulation de nanoparticules dans le foie (Su et al., 2024).

Le stockage représente un défi majeur pour les formulations de LNP, qui peut avoir un impact direct sur l'efficacité thérapeutique. Des conditions de conservation inadaptées peuvent en effet compromettre l'efficacité des formulations. L'instabilité des LNPs est principalement due à des cascades réactionnelles initiées par l'hydrolyse et l'oxydation des lipides. Ces processus génèrent des impuretés capables de former des adduits avec l'ARNm par liaison covalente, ce qui peut entraîner l'hydrolyse de l'ARNm et réduire drastiquement l'efficacité de la transfection (Cheng et al., 2023).

Plusieurs stratégies d'optimisation ont été développées : l'incorporation de lipides ionisables modifiés, notamment des lipides pipéridines, permet de stocker les LNPs en

solution à 4 °C pendant 5 mois (Hashiba et al., 2024) ; la lyophilisation élimine l'eau et permet d'atteindre des durées de stockage longues, par exemple 18 mois à 5 °C pour le vaccin ARNm-LNP contre le cytomégalo virus (mRNA-1647) développé par Moderna (Cheng et al., 2023) ou 15 mois à 4 °C pour des liposomes appelés LYX (Ngalle Loth et al., 2025), avec l'ajout indispensable de cryoprotecteurs tels que le tréhalose ou le sucre. Ces avancées technologiques permettent de distribuer plus facilement les thérapies innovantes à base d'ARNm, ce qui réduit significativement les coûts logistiques et élargit l'accès aux régions disposant de peu d'infrastructures de réfrigération.

Il convient de souligner que j'ai évoqué quelques axes d'amélioration des formulations de LNP pour la délivrance d'ARNm, et que le nombre d'études consacrées à ce domaine a connu une croissance exponentielle, tant dans le milieu académique que dans l'industrie.

La deuxième partie était consacrée à l'optimisation de l'ARNm (Medjmedj et al., 2025)

Dans cette étude, nous avons cherché à identifier une combinaison d'UTR permettant d'améliorer la traduction et/ou la stabilité de l'ARNm synthétique. Nous avons également testé en parallèle une queue hétérogène appelée « A/G tail » dans notre étude. Comme indiqué précédemment, les UTRs et la queue, bien qu'ils ne fassent pas partie de la région codante de l'ARNm, jouent un rôle très important dans la stabilité et la traduction de l'ARNm, et par conséquent dans l'efficacité thérapeutique de l'ARNm synthétique. Les résultats majeurs de notre étude sont les suivants : (i) la queue A/G est stable sur l'ADN plasmidique après amplification dans les bactéries et offre des performances similaires à la queue A30L70 développée par BioNTech ; (ii) les faibles performances des UTRs dites cap indépendantes ou IRES (Internal Ribosome Entry Site). (iii) L'efficacité des combinaisons UTR dépend du CDS et du type cellulaire ; (iv) les 3'UTR du VP6 du rotavirus et de la MnSOD présentent une efficacité similaire à la 3'UTR AES-mtRNR1 (référence de notre étude).

L'instabilité de la queue poly(A) lors de l'amplification plasmidique dans les systèmes bactériens constitue un défi majeur pour la production d'ARNm par polyadénylation co-transcriptionnelle. Cette instabilité, caractérisée par un raccourcissement de la séquence poly(A), affecte directement l'efficacité de la traduction de l'ARNm. La polyadénylation post-transcriptionnelle n'est pas la meilleure solution pour pallier cette limite, car il est impossible de contrôler la taille de la séquence ajoutée, ce qui génère une hétérogénéité

de taille. Sans compter le coût supplémentaire lié à la réaction et à la purification. D'autres solutions ont été développées pour garantir une stabilité optimale de l'ADN plasmatique lors de l'amplification dans les systèmes bactériens, ainsi que pour améliorer la stabilité de la traduction de l'ARNm thérapeutique (EBERLE et al., 2016; Li et al., 2022; Lim et al., 2018). Notre queue A/G s'inspire de l'étude de Lim *et al.*, qui ont montré que l'ajout d'un G dans la queue poly(A) augmentait la demi-vie de l'ARNm en retardant la déadénylation (Lim et al., 2018). Nous avons répété le motif (10A)G douze fois, ce qui donne une taille de 132 nucléotides. Cette queue peut être optimisée en modifiant le pourcentage et/ou la position de G, en incorporant d'autres nucléosides, notamment la cytidine (C), qui a permis d'augmenter la traduction et de prolonger la stabilité de l'ARNm synthétique *in vitro* et *in vivo* (Li et al., 2022). Les PABP cytoplasmiques (PABPC) se fixent dans une fenêtre de 23 à 27 nucléotides (Sawazaki et al., 2018). Il serait donc intéressant de caractériser l'interaction avec les PABPC pour évaluer l'impact de la présence de G ou de C dans les queues hétérogènes.

Pour optimiser les régions non traduites, il est essentiel d'adopter une approche rationnelle dans la conception afin d'identifier une combinaison 5' UTR-3' UTR optimale. Cependant, jusqu'à présent, il n'existe pas de consensus sur les UTRs optimales à utiliser dans des applications biomédicales spécifiques. L'identification de nouvelles 5'UTR par des approches computationnelles est apparue comme un nouvel outil permettant d'améliorer la traduction des ARNm thérapeutiques. Néanmoins, utiliser uniquement la séquence de la 5'UTR pour évaluer le mean ribosome load (MRL) n'est pas suffisant. Dans notre étude, nous avons montré que des ARNm avec la même 5' UTR et des 3' UTR différentes ne sont pas traduits avec la même efficacité. Prenons l'exemple de la 5' UTR4, identifiée par une approche *silico* (Linares-Fernández et al., 2021). Cette 5' UTR4, combinée à la 3' UTR MnSOD, résulte en une faible traduction, comparée à la combinaison avec la 3' UTR AES-mtRNR1 (la 3' UTR de référence). De plus, si une paire d'UTR particulière surpasse une autre avec la même région codante, rien ne garantit que cela sera vrai pour d'autres séquences codantes. Comme c'est le cas dans notre étude, où la combinaison de la 5'NeoUTR3 et de la 3'AES-mtRNR1 a donné des résultats complètement différents selon le CDS (nanoluc ou FLuc). Ces résultats soulignent l'impact des séquences de l'ARNm sur son repliement, et donc sur son accessibilité à la traduction.

Une étude menée par l'équipe de Steve Pascolo a montré qu'un ARNm synthétique dit « minimaliste », contenant une 5' UTR courte de 4 nucléotides (CAAG) et sans 3' UTR, permettait d'obtenir un taux d'anticorps similaire à celui d'un ARNm dit optimal contenant une 5'UTR sous forme d'aptamère qui recrute eIF4G dit «eIF4G aptamer» et une 3'UTR de mtRNR1-AES (Mamaghani et al., 2024). Dans le cadre de l'optimisation de l'ARNm par sélection d'UTR, il est nécessaire de souligner l'incohérence du choix des UTR de référence, ce qui rend la comparaison quasi impossible entre les différentes études. Nous avons fait le choix d'utiliser les UTRs de BioNTech dans le vaccin contre le Covid-19 comme référence, mais d'autres études prennent comme référence des constructions beaucoup moins efficaces non validées cliniquement : un ARN sans UTR (Ferizi et al., 2016), la bêta-globine humaine ou du xénope (Linares-Fernández et al., 2021), l'eIF4G aptamer (Mamaghani et al., 2024), etc. En tenant compte des observations citées ci-dessus, il faut selon moi interpréter avec prudence les affirmations concernant les « meilleurs » UTR.

Pour les 3' UTR, nous avons choisi la séquence du VP6 du rotavirus et la 3' UTR de la MnSOD en raison de la présence de translation enhancer (TE) dans ces séquences. D'autres paramètres de la 3'UTR peuvent également influencer directement la traduction et la demi-vie de l'ARNm, comme la longueur de la séquence, la présence d'éléments riches en AU (AU-rich element ou ARE) ou d'éléments de réponse aux micro-ARN (MRE). La longueur de la région 3' UTR doit être optimale, car les ARNm dont la région 3' UTR est très longue ont une demi-vie plus courte (Schwanhäusser et al., 2011), tandis que les ARNm dont la région 3' UTR est très courte sont traduits moins efficacement (Tanguay & Gallie, 1996). Plusieurs protéines cytoplasmiques peuvent se lier aux ARE, parmi lesquelles HuR est l'une des rares protéines capables de stabiliser l'ARN cible. Contrairement à de nombreuses protéines de liaison à l'ARN qui accélèrent la dégradation de l'ARN, HuR joue un rôle crucial dans l'amélioration de la stabilité et de la traduction de l'ARN en se liant aux éléments riches en AU. L'équipe de Jiaqi Lin a exploité cette propriété de manière intelligente pour améliorer la stabilité de l'ARNm et sa traduction en insérant des séquences AU reconnues par HuR. Ils ont démontré que l'emplacement idéal de ces éléments se situait juste entre la séquence codante et la 3' UTR. Ils ont également optimisé la longueur de la séquence riche en motifs AUUUA répétés 15 fois, soit 60 nucléotides. (Ma et al., 2025). Pour une expression optimale de l'ARNm synthétique, il est très important de

prendre en compte la spécificité du tissu cible de l'application thérapeutique, notamment la présence de certains microARN. En se basant sur la présence ou l'absence de certains microARN dans le tissu d'intérêt, il est possible d'ajouter ou de retirer des sites MRE afin de favoriser la traduction dans un tissu plutôt qu'un autre. C'est le cas du miR142, qui est l'un des miARN spécifiques aux cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Majowicz et al., 2013). Pour une application de vaccination, il faut s'assurer que la 3' UTR ne contient pas ces sites de fixation afin de favoriser la traduction et donc la production de l'antigène, mais pour une application de protéines de remplacement, il faut ajouter ces sites pour empêcher la traduction dans les APC et donc éviter une réaction d'immunogénicité. Il convient de noter que les enjeux d'optimisation de l'ARNm pour une application thérapeutique et pour la vaccination ne sont pas exactement les mêmes. Dans un contexte vaccinal, une immunogénicité contrôlée est souhaitée, l'objectif étant de générer une activation efficace du système immunitaire sans que la traduction de l'ARNm soit durable. En revanche, pour une application thérapeutique telle que le remplacement de protéines, l'enjeu majeur consiste à éviter l'activation du système immunitaire et à garantir une expression durable de la protéine d'intérêt.

Outre l'optimisation des séquences d'ARNm synthétiques, les paramètres de la transcription *in vitro* (IVT) et le choix de la méthode de purification en aval sont essentiels pour améliorer l'efficacité de la traduction. L'objectif est de réduire au maximum les sous-produits de la réaction de transcription *in vitro*, notamment les dsRNA les ARNm tronqués, et de récupérer une seule population d'ARNm full-length. La qualité de la matrice d'ADN, le choix de la polymérase ARN, la température et la durée de la réaction influencent la qualité de l'ARNm ainsi que la quantité de sous-produits générés. Ces paramètres sont discutés dans la littérature (pour revue (J. Zhang et al., 2023; Lenk et al., 2024)).

Les thérapies à base d'ARNm décrites dans notre étude et dans ma thèse englobent principalement l'ARNm IVT traditionnel. Cependant, la technologie de l'ARNm étant en constante innovation et évolution, d'autres formes de médicaments à base d'ARNm, tels que self-amplifying mRNA, trans-amplifying mRNA, and circRNA, présentent d'immenses possibilités d'application.

Conclusion et perspectives

La médecine basée sur l'ARN messenger marque un tournant dans notre manière de traiter, voire de guérir, les maladies. Les avancées technologiques dans le domaine de l'ARN messenger ont permis d'améliorer la stabilité, de réduire l'immunogénicité et d'augmenter l'expression, mais des défis subsistent pour éliminer tout risque d'effets indésirables et pour optimiser l'expression, la durée et la stabilité, afin de permettre l'émergence potentielle de médicaments à base d'ARNm prêts à l'emploi. De plus, des normes plus strictes doivent être respectées pour passer à des applications non vaccinales, car des progrès supplémentaires sont nécessaires pour générer des plateformes thérapeutiques à base d'ARNm efficaces et ciblées, capables de délivrer l'ARNm de manière sûre aux cellules souhaitées, sans problèmes de biodistribution hors cible, d'immunogénicité ou de toxicité.

Dans notre équipe, nous travaillons sur les deux axes qui permettent d'améliorer et de booster la technologie ARNm-LNP, à savoir les LNPs et l'ingénierie de la séquence de l'ARNm, pour des applications vaccinales ainsi que dans le domaine de la médecine régénérative.

La première partie de ma thèse visait à optimiser une formulation de nanoparticules lipidiques pour la délivrance de l'ARNm en modifiant les lipides helper. Nous avons mis en évidence l'effet combiné du DOPE et du β -sitostérol, qui améliorent l'efficacité de la délivrance d'ARNm par des LNPs *in vivo*. La deuxième partie visait à optimiser la séquence de l'ARNm en testant une sélection d'UTR et une queue hétérogène. Bien que nous n'ayons pas identifié de combinaison d'UTR nettement plus performante que celle utilisée dans le vaccin Pfizer-BioNTech (5' UTR hAg et 3' UTR AES-mtRNR1), notre étude enrichit les connaissances dans le domaine de l'optimisation de l'ARNm synthétique. Contrairement aux études précédentes qui optimisent séparément les domaines de l'ARNm, notre étude souligne l'importance de prendre en compte l'ensemble de la séquence de l'ARNm, les paramètres de production de l'ARNm par transcription *in vitro* et le type de cellules cibles de l'application souhaitée.

À mon avis, l'avenir de l'optimisation de la technologie ARNm-LNP reposera majoritairement sur l'utilisation de l'intelligence artificielle pour la conception de séquences d'ARNm, de nouveaux lipides ionisables et pour le ciblage des LNPs. Les chercheurs ont déjà commencé à utiliser cette approche. Pour les LNPs, on trouve AGILE (AI-Guided Ionizable Lipid Engineering), une plateforme qui associe le deep learning et la chimie combinatoire. AGILE permet de rationaliser le développement de lipides ionisables grâce à une conception efficace de bibliothèques, à un criblage *in silico* des lipides via des réseaux neuronaux profonds et à une adaptabilité à diverses lignées cellulaires. Selon les auteurs, AGILE permet de concevoir, de synthétiser et d'évaluer rapidement des lipides ionisables pour l'administration d'ARNm, en effectuant une sélection parmi une vaste bibliothèque (Xu et al., 2024). Pour l'optimisation de l'ARNm, on trouve GEMORNA (Generative models for RNA). GEMORNA est un modèle d'ARN génératif qui utilise des architectures Transformer adaptées aux séquences codantes et aux régions non traduites de l'ARNm afin de concevoir de nouveaux ARNm présentant une expression et une stabilité améliorées. Les ARNm complets conçus par GEMORNA ont montré une augmentation de l'expression de la firefly luciférase pouvant aller jusqu'à 41 fois supérieure par rapport aux ARNm de référence *in vitro* (H. Zhang et al., 2025). Cependant, l'efficacité de l'IA dépend directement des données d'entraînement des algorithmes, ce qui souligne la nécessité de générer des résultats de qualité pour entraîner les différents algorithmes.

Au-delà de l'utilisation de l'IA pour optimiser la technologie ARNm-LNP, la communauté scientifique, qu'elle soit académique ou industrielle, poursuit les innovations sur tous les axes afin de renforcer la robustesse de cette technologie et d'élargir ses applications à diverses pathologies, notamment en médecine personnalisée. Dans cette optique, l'équipe conçoit et synthétise de nouveaux lipides ionisables et conjugue des ligands aux LNPs afin de cibler spécifiquement le cancer du poumon et le tissu osseux.

Références

- 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., Lin, K.-P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., Kim, B. J., ... Suhr, O. B. (2018). Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 379(1), 11-21.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153>
- Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Anisimova, A. S., Makeeva, D. S., Arkhipova, V. I., Stolboushkina, E. A., Garber, M. B., Prokofjeva, M. M., Spirin, P. V., Prassolov, V. S., Shatsky, I. N., & Dmitriev, S. E. (2016). Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep37905>
- Álvarez-Benedicto, E., Farbiak, L., Ramírez, M. M., Wang, X., Johnson, L. T., Mian, O., Guerrero, E. D., & Siegwart, D. J. (2022). Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). *Biomaterials Science*, 10(2), 549-559. <https://doi.org/10.1039/D1BM01454D>
- Ambrosini, C., Destefanis, E., Kheir, E., Broso, F., Alessandrini, F., Longhi, S., Battisti, N., Pesce, I., Dassi, E., Petris, G., Cereseto, A., & Quattrone, A. (2022). Translational enhancement by base editing of the Kozak sequence rescues haploinsufficiency. *Nucleic Acids Research*, 50(18), 10756-10771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac799>
- Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J.-H., & Tsien, R. Y. (2006). Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*, 12(5), 851-861.
<https://doi.org/10.1261/rna.2309906>
- Baiersdörfer, M., Boros, G., Muramatsu, H., Mahiny, A., Vlatkovic, I., Sahin, U., & Karikó, K. (2019). A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 15, 26-35.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.018>
- Bangham, A. D. (1993). Liposomes : The Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1), 275-285. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90071-A](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90071-A)
- Barbieri, B. D., Peeler, D. J., Samnuan, K., Day, S., Hu, K., Sallah, H. J., Tregoning, J. S., McKay, P. F., & Shattock, R. J. (2024). The role of helper lipids in optimising nanoparticle formulations of self-amplifying RNA. *Journal of Controlled Release*, 374, 280-292.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.08.016>
- Baronti, L., Karlsson, H., Marušič, M., & Petzold, K. (2018). A guide to large-scale RNA sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(14), 3239-3252.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0943-8>
- Biziaev, N., Shuvalov, A., Salman, A., Egorova, T., Shuvalova, E., & Alkalaeva, E. (2024). The impact of mRNA poly(A) tail length on eukaryotic translation stages. *Nucleic Acids Research*, 52(13), 7792-7808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae510>
- Bolsoni, J., Liu, D., Mohabatpour, F., Ebner, R., Sadhnani, G., Tafech, B., Leung, J., Shanta, S., An, K., Morin, T., Chen, Y., Arguello, A., Choate, K., Jan, E., Ross, C. J. D., Brambilla, D., Witzigmann, D., Kulkarni, J., Cullis, P. R., & Hedtrich, S. (2023). Lipid Nanoparticle-

- Mediated Hit-and-Run Approaches Yield Efficient and Safe In Situ Gene Editing in Human Skin. *ACS Nano*, 17(21), 22046-22059. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c08644>
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature*, 190(4776), 576-581. <https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Brimacombe, C. A., Kulkarni, J. A., Cheng, M. H. Y., An, K., Witzigmann, D., & Cullis, P. R. (2025). Rational design of lipid nanoparticles for enabling gene therapies. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 33(3), 101518. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2025.101518>
- Cannarozzi, G., Schraudolph, N. N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M. T., Roth, A. C., Gonnet, P., Gonnet, G., & Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell*, 141(2), 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.036>
- Chaudhary, N., Kasiewicz, L. N., Newby, A. N., Arral, M. L., Yerneni, S. S., Melamed, J. R., LoPresti, S. T., Fein, K. C., Strelkova Petersen, D. M., Kumar, S., Purwar, R., & Whitehead, K. A. (2024). Amine headgroups in ionizable lipids drive immune responses to lipid nanoparticles by binding to the receptors TLR4 and CD1d. *Nature Biomedical Engineering*, 8(11), 1483-1498. <https://doi.org/10.1038/s41551-024-01256-w>
- Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases : Principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(11), 817-838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chen, H., Liu, D., Aditham, A., Guo, J., Huang, J., Kostas, F., Maher, K., Friedrich, M. J., Xavier, R. J., Zhang, F., & Wang, X. (2025). Chemical and topological design of multicapped mRNA and capped circular RNA to augment translation. *Nature Biotechnology*, 43(7), 1128-1143. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02393-y>
- Chen, H., Liu, D., Guo, J., Aditham, A., Zhou, Y., Tian, J., Luo, S., Ren, J., Hsu, A., Huang, J., Kostas, F., Wu, M., Liu, D. R., & Wang, X. (2025). Branched chemically modified poly(A) tails enhance the translation capacity of mRNA. *Nature Biotechnology*, 43(2), 194-203. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02174-7>
- Cheng, F., Wang, Y., Bai, Y., Liang, Z., Mao, Q., Liu, D., Wu, X., & Xu, M. (2023). Research Advances on the Stability of mRNA Vaccines. *Viruses*, 15(3), 668. <https://doi.org/10.3390/v15030668>
- Cole, A. (2008). Child in gene therapy programme develops leukaemia. *BMJ : British Medical Journal*, 336(7634), 13. <https://doi.org/10.1136/bmj.39436.582292.DB>
- Conry, R. M., LoBuglio, A. F., Wright, M., Sumerel, L., Pike, M. J., Johanning, F., Benjamin, R., Lu, D., & Curiel, D. T. (1995). Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector1. *Cancer Research*, 55(7), 1397-1400.
- Cullis, P. R., & Felgner, P. L. (2024). The 60-year evolution of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(9), 709-722. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00977-6>
- Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Züst, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G. C., Fensterl, V., Klimstra, W. B., Pierson, T. C., Buller, R. M., Gale Jr, M., Shi, P.-Y., & Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 468(7322), 452-456. <https://doi.org/10.1038/nature09489>

- Deng, M., Wang, X., Xiong, Z., & Tang, P. (2023). Control of RNA degradation in cell fate decision. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1164546>
- Dilliard, S. A., Cheng, Q., & Siegwart, D. J. (2021). On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(52), e2109256118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109256118>
- Dimitriadis, G. J. (1978). Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature*, 274(5674), 923-924. <https://doi.org/10.1038/274923a0>
- EBERLE, F., Sahin, U., Kuhn, A., Vallazza, B., & DIKEN, M. (2016). *Stabilization of poly(a) sequence encoding dna sequences* (World Intellectual Property Organization Brevet No. WO2016005004A1). <https://patents.google.com/patent/WO2016005004A1/en>
- Eygeris, Y., Gupta, M., Kim, J., & Sahay, G. (2022). Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Accounts of Chemical Research*, 55(1), 2-12. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>
- Eygeris, Y., Patel, S., Jozic, A., & Sahay, G. (2020). Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano Letters*, 20(6), 4543-4549. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386>
- Fang, E., Liu, X., Li, M., Zhang, Z., Song, L., Zhu, B., Wu, X., Liu, J., Zhao, D., & Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00950-y>
- Farnung, L., & Vos, S. M. (2022). Assembly of RNA polymerase II transcription initiation complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 73, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102335>
- Ferizi, M., Aneja, M. K., Balmayor, E. R., Badieyan, Z. S., Mykhaylyk, O., Rudolph, C., & Plank, C. (2016). Human cellular CYBA UTR sequences increase mRNA translation without affecting the half-life of recombinant RNA transcripts. *Scientific Reports*, 6(1), 39149. <https://doi.org/10.1038/srep39149>
- Furuno, M., Kasukawa, T., Saito, R., Adachi, J., Suzuki, H., Baldarelli, R., Hayashizaki, Y., & Okazaki, Y. (2003). CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Research*, 13(6b), 1478-1487. <https://doi.org/10.1101/gr.1060303>
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development*, 5(11), 2108-2116. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.2108>
- Galloway, A., & Cowling, V. H. (2019). mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.09.011>
- Garneau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 113-126. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>
- Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., Manygoats, K., Seifert, S., Andree, C., Stöter, M., Epstein-Barash, H., Zhang, L., Koteliansky, V., Fitzgerald, K., Fava, E., Bickle, M., Kalaidzidis, Y., Akinc, A., Maier, M., & Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology*, 31(7), 638-646. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>

- Gumińska, N., Matylla-Kulińska, K., Krawczyk, P. S., Maj, M., Orzeł, W., Mackiewicz, Z., Brouze, A., Mroczek, S., & Dziembowski, A. (2025). Direct profiling of non-adenosines in poly(A) tails of endogenous and therapeutic mRNAs with Ninetails. *Nature Communications*, 16(1), 2664. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57787-6>
- Halamoda-Kenzaoui, B., Vandebriel, R. J., Howarth, A., Siccardi, M., David, C. A. W., Liptrott, N. J., Santin, M., Borgos, S. E., Bremer-Hoffmann, S., & Caputo, F. (2021). Methodological needs in the quality and safety characterisation of nanotechnology-based health products : Priorities for method development and standardisation. *Journal of Controlled Release*, 336, 192-206. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.016>
- Hald Albertsen, C., Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Lind, M., Petersson, K., & Simonsen, J. B. (2022). The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 188, 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>
- Hashiba, K., Taguchi, M., Sakamoto, S., Otsu, A., Maeda, Y., Ebe, H., Okazaki, A., Harashima, H., & Sato, Y. (2024). Overcoming thermostability challenges in mRNA–lipid nanoparticle systems with piperidine-based ionizable lipids. *Communications Biology*, 7(1), 556. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06235-0>
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2016). Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>
- Hope, M. J., Mui, B., Ansell, S., & Ahkong, Q. F. (1998). Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (Review). *Molecular Membrane Biology*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.3109/09687689809027512>
- Hunter, T. L., Bao, Y., Zhang, Y., Matsuda, D., Riener, R., Wang, A., Li, J. J., Soldevila, F., Chu, D. S. H., Nguyen, D. P., Yong, Q.-C., Ross, B., Nguyen, M., Vestal, J., Roberts, S., Galvan, D., Vega, J. B., Jhung, D., Butcher, M., ... Aghajanian, H. (2025). In vivo CAR T cell generation to treat cancer and autoimmune disease. *Science*, 388(6753), 1311-1317. <https://doi.org/10.1126/science.ads8473>
- Huntzinger, E., & Izauralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs : Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 113-127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jayaraman, M., Ansell, S. M., Mui, B. L., Tam, Y. K., Chen, J., Du, X., Butler, D., Eltepu, L., Matsuda, S., Narayanannair, J. K., Rajeev, K. G., Hafez, I. M., Akinc, A., Maier, M. A., Tracy, M. A., Cullis, P. R., Madden, T. D., Manoharan, M., & Hope, M. J. (2012). Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(34), 8529-8533. <https://doi.org/10.1002/anie.201203263>
- Kang, D. D., Li, H., & Dong, Y. (2023). Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 199, 114961. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114961>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors : The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>

- Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy : HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(21), e142. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>
- Kauffman, K. J., Dorkin, J. R., Yang, J. H., Heartlein, M. W., DeRosa, F., Mir, F. F., Fenton, O. S., & Anderson, D. G. (2015). Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15(11), 7300-7306. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02497>
- Kis, Z., Kontoravdi, C., Dey, A. K., Shattock, R., & Shah, N. (2020). Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response. *Journal of Advanced Manufacturing and Processing*, 2(3), e10060. <https://doi.org/10.1002/amp2.10060>
- Klöcker, N., Weissenboeck, F. P., van Dülmen, M., Špaček, P., Hüwel, S., & Rentmeister, A. (2022). Photocaged 5' cap analogues for optical control of mRNA translation in cells. *Nature Chemistry*, 14(8), 905-913. <https://doi.org/10.1038/s41557-022-00972-7>
- Koeberl, D., Schulze, A., Sondheimer, N., Lipshutz, G. S., Geberhiwot, T., Li, L., Saini, R., Luo, J., Sikirica, V., Jin, L., Liang, M., Leuchars, M., & Grunewald, S. (2024). Interim analyses of a first-in-human phase 1/2 mRNA trial for propionic acidaemia. *Nature*, 628(8009), 872-877. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07266-7>
- Kozak, M. (1989). Circumstances and Mechanisms of Inhibition of Translation by Secondary Structure in Eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.5134-5142.1989>
- Kwon, S., Kwon, M., Im, S., Lee, K., & Lee, H. (2022). mRNA vaccines : The most recent clinical applications of synthetic mRNA. *Archives of Pharmacal Research*, 45(4), 245-262. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01381-7>
- Langberg, S. R., & Moss, B. (1981). Post-transcriptional modifications of mRNA. Purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2'-)-methyltransferases from HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 10054-10060.
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7)
- Legnini, I., Alles, J., Karaikos, N., Ayoub, S., & Rajewsky, N. (2019). FLAM-seq : Full-length mRNA sequencing reveals principles of poly(A) tail length control. *Nature Methods*, 16(9), 879-886. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0503-y>
- Lenk, R., Kleindienst, W., Szabó, G. T., Baiersdörfer, M., Boros, G., Keller, J. M., Mahiny, A. J., & Vlatkovic, I. (2024). Understanding the impact of in vitro transcription byproducts and contaminants. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1426129>
- Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(3), 158-174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>
- Leung, A. K. K., Tam, Y. Y. C., & Cullis, P. R. (2014). Chapter Four—Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. In L. Huang, D. Liu, & E. Wagner (Éds.), *Advances in Genetics* (Vol. 88, p. 71-110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800148-6.00004-3>
- Li, C. Y., Liang, Z., Hu, Y., Zhang, H., Setiasabda, K. D., Li, J., Ma, S., Xia, X., & Kuang, Y. (2022). Cytidine-containing tails robustly enhance and prolong protein production of synthetic

- p mRNA in cell and in vivo.
- Molecular Therapy Nucleic Acids*
- , 30, 300-310.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.10.003>
- Lim, J., Kim, D., Lee, Y., Ha, M., Lee, M., Yeo, J., Chang, H., Song, J., Ahn, K., & Kim, V. N. (2018). Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.aam5794>
- Lin, Y., Cheng, Q., & Wei, T. (2023). Surface engineering of lipid nanoparticles : Targeted nucleic acid delivery and beyond. *Biophysics Reports*, 9(5), 255-278.
<https://doi.org/10.52601/bpr.2023.230022>
- Linares-Fernández, S., Moreno, J., Lambert, E., Mercier-Gouy, P., Vachez, L., Verrier, B., & Exposito, J.-Y. (2021). Combining an optimized mRNA template with a double purification process allows strong expression of in vitro transcribed mRNA. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 26, 945-956. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.10.007>
- Liu, Z., Wang, S., Tapeinos, C., Torrieri, G., Känkänen, V., El-Sayed, N., Python, A., Hirvonen, J. T., & Santos, H. A. (2021). Non-viral nanoparticles for RNA interference : Principles of design and practical guidelines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174, 576-612.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.018>
- Lockard, R. E., & Lingrel, J. B. (1969). The synthesis of mouse hemoglobin beta-chains in a rabbit reticulocyte cell-free system programmed with mouse reticulocyte 9S RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(2), 204-212.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(69\)90720-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(69)90720-7)
- Lokugamage, M. P., Vanover, D., Beyersdorf, J., Hatit, M. Z. C., Rotolo, L., Echeverri, E. S., Peck, H. E., Ni, H., Yoon, J.-K., Kim, Y., Santangelo, P. J., & Dahlman, J. E. (2021). Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nature Biomedical Engineering*, 5(9), 1059-1068. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00786-x>
- Lu, R.-M., Hsu, H.-E., Perez, S. J. L. P., Kumari, M., Chen, G.-H., Hong, M.-H., Lin, Y.-S., Liu, C.-H., Ko, S.-H., Concio, C. A. P., Su, Y.-J., Chang, Y.-H., Li, W.-S., & Wu, H.-C. (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>
- Ma, X., Liu, S., Fan, B., Jin, D., Miao, L., Liu, L., Du, S., & Lin, J. (2025). Enhancing mRNA translation efficiency by introducing sequence optimized AU-rich elements in 3' UTR via HuR anchorage. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 36(2), 102485.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102485>
- Majowicz, A., Maczuga, P., Kwikkers, K. L., van der Marel, S., van Logtenstein, R., Petry, H., van Deventer, S. J., Konstantinova, P., & Ferreira, V. (2013). Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *The Journal of Gene Medicine*, 15(6-7), 219-232.
<https://doi.org/10.1002/jgm.2712>
- Malone, R. W., Felgner, P. L., & Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6077-6081. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077>
- Mamaghani, S., Penna, R. R., Frei, J., Wyss, C., Mellett, M., Look, T., Weiss, T., Guenova, E., Kündig, T. M., Lauchli, S., & Pascolo, S. (2024). Synthetic mRNAs Containing Minimalistic Untranslated Regions Are Highly Functional In Vitro and In Vivo. *Cells*, 13(15), 1242.
<https://doi.org/10.3390/cells13151242>

- Mandell, Z. F., Ujita, A., Henderson, J., Truong, A., Vo, C., Rezvani, F., Abolhassani, N., Lebedev, A., Xu, C., Koukhareva, I., Ramos, S., Broderick, K., Hudson, B., & Collier, J. (2025). CleanCap M6 inhibits decapping of exogenously delivered IVT mRNA. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 36(1), 102456. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102456>
- Mayr, C. (2017). Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annual Review of Genetics*, 51(Volume 51, 2017), 171-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024704>
- Mayr, C. (2019). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(10), a034728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- Medjmedj, A., Genon, H., Hezili, D., Loth, A. N., Clemençon, R., Guimpied, C., Mollet, L., Bigot, A., Wien, F., Hamacek, J., Chapat, C., & Perche, F. (2025). Evaluation of synthetic mRNA with selected UTR sequences and alternative poly(A) tail, in vitro and in vivo. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 36(3). <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102648>
- Medjmedj, A., Ngalle-Loth, A., Clemençon, R., Hamacek, J., Pichon, C., & Perche, F. (2022). In Cellulo and In Vivo Comparison of Cholesterol, Beta-Sitosterol and Dioleoylphosphatidylethanolamine for Lipid Nanoparticle Formulation of mRNA. *Nanomaterials*, 12(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/nano12142446>
- Monaghan, L., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2023). Translation-coupled mRNA quality control mechanisms. *The EMBO Journal*, 42(19), e114378. <https://doi.org/10.15252/embj.2023114378>
- Mu, X., Greenwald, E., Ahmad, S., & Hur, S. (2018). An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Research*, 46(10), 5239-5249. <https://doi.org/10.1093/nar/gky177>
- Muthukrishnan, S., Both, G. W., Furuichi, Y., & Shatkin, A. J. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*, 255(5503), 33-37. <https://doi.org/10.1038/255033a0>
- Ngalle Loth, A., Maroquenne, M., Medjmedj, A., Coste, F., Bizien, T., Pichon, C., Logeart-Avramoglou, D., & Perche, F. (2025). Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 379, 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.01.010>
- Nicholson, A. L., & Pasquinelli, A. E. (2019). Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.11.002>
- Niessen, A. G. O. von, Poleganov, M. A., Rechner, C., Plaschke, A., Kranz, L. M., Fesser, S., Diken, M., Löwer, M., Vallazza, B., Beissert, T., Bukur, V., Kuhn, A. N., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2019). Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Molecular Therapy*, 27(4), 824-836. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.011>
- Nogueira, S. S., Samaridou, E., Simon, J., Frank, S., Beck-Broichsitter, M., & Mehta, A. (2024). Analytical techniques for the characterization of nanoparticles for mRNA delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 198, 114235. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114235>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

- Ostro, M. J., Giacomoni, D., Lavelle, D., Paxton, W., & Dray, S. (1978). Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposomemediated insertion into a human cell line. *Nature*, 274(5674), 921-923. <https://doi.org/10.1038/274921a0>
- Padilla, M. S., Mrksich, K., Wang, Y., Haley, R. M., Li, J. J., Han, E. L., El-Mayta, R., Kim, E. H., Dias, S., Gong, N., Teerdhala, S. V., Han, X., Chowdhary, V., Xue, L., Siddiqui, Z., Yamagata, H. M., Kim, D., Yoon, I.-C., Wilson, J. M., ... Mitchell, M. J. (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>
- Passmore, L. A., & Collier, J. (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, P., Ibrahim, N. M., & Cheng, K. (2021). The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(6), 448-460. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>
- Patel, S., Ashwanikumar, N., Robinson, E., Xia, Y., Mihai, C., Griffith, J. P., Hou, S., Esposito, A. A., Ketova, T., Welsher, K., Joyal, J. L., Almarsson, Ö., & Sahay, G. (2020a). 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>
- Patel, S., Ashwanikumar, N., Robinson, E., Xia, Y., Mihai, C., Griffith, J. P., Hou, S., Esposito, A. A., Ketova, T., Welsher, K., Joyal, J. L., Almarsson, Ö., & Sahay, G. (2020b). 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>
- Ponti, F., Campolungo, M., Melchiori, C., Bono, N., & Candiani, G. (2021). Cationic lipids for gene delivery : Many players, one goal. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235, 105032. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105032>
- Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., Zheng, Q., Li, G., Teng, Y., Wu, M., & Song, X. (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>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S.-H. (2016). mRNA capping : Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511-7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Ren, F., Zhang, N., Zhang, L., Miller, E., & Pu, J. J. (2020). Alternative Polyadenylation : A new frontier in post transcriptional regulation. *Biomarker Research*, 8(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00249-6>
- S, P. R., Banerjee, R., Drummond, C. J., & Conn, C. E. (2024). Permanently Charged Cationic Lipids—Evolution from Excipients to Therapeutic Lipids. *Small Science*, 4(7), 2300270. <https://doi.org/10.1002/smssc.202300270>
- Sahin, U., Karikó, K., & Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics—Developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(10), 759-780. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>
- Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E., Vogler, I., Kranz, L. M., Vormehr, M., Baum, A., Pascal, K., Quandt, J., Maurus, D., Brachtendorf, S., Lörks, V., Sikorski, J., Hilker, R., Becker, D.,

- Eller, A.-K., Grützner, J., Boesler, C., Rosenbaum, C., ... Türeci, Ö. (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, 586(7830), 594-599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
- Sample, P. J., Wang, B., Reid, D. W., Presnyak, V., McFadyen, I. J., Morris, D. R., & Seelig, G. (2019a). Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature Biotechnology*, 37(7), 803-809. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0164-5>
- Sample, P. J., Wang, B., Reid, D. W., Presnyak, V., McFadyen, I. J., Morris, D. R., & Seelig, G. (2019b). Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature Biotechnology*, 37(7), 803-809. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0164-5>
- Sawazaki, R., Imai, S., Yokogawa, M., Hosoda, N., Hoshino, S., Mio, M., Mio, K., Shimada, I., & Osawa, M. (2018). Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail. *Scientific Reports*, 8(1), 1455. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19659-6>
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Sebastiani, F., Yanez Arteta, M., Lerche, M., Porcar, L., Lang, C., Bragg, R. A., Elmore, C. S., Krishnamurthy, V. R., Russell, R. A., Darwish, T., Pichler, H., Waldie, S., Moulin, M., Haertlein, M., Forsyth, V. T., Lindfors, L., & Cárdenas, M. (2021). Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano*, 15(4), 6709-6722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10064>
- Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Sah, D. W. Y., Stebbing, D., Crosley, E. J., Yaworski, E., Hafez, I. M., Dorkin, J. R., Qin, J., Lam, K., Rajeev, K. G., Wong, K. F., Jeffs, L. B., Nechev, L., Eisenhardt, M. L., ... Hope, M. J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*, 28(2), 172-176. <https://doi.org/10.1038/nbt.1602>
- Semple, S. C., Klimuk, S. K., Harasym, T. O., Dos Santos, N., Ansell, S. M., Wong, K. F., Maurer, N., Stark, H., Cullis, P. R., Hope, M. J., & Scherrer, P. (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), 152-166. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00343-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00343-6)
- Seo, H., Jeon, L., Kwon, J., & Lee, H. (2023). High-Precision Synthesis of RNA-Loaded Lipid Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 12(13), 2203033. <https://doi.org/10.1002/adhm.202203033>
- Shepherd, S. J., Han, X., Mukalel, A. J., El-Mayta, R., Thatte, A. S., Wu, J., Padilla, M. S., Alameh, M.-G., Srikumar, N., Lee, D., Weissman, D., Issadore, D., & Mitchell, M. J. (2023). Throughput-scalable manufacturing of SARS-CoV-2 mRNA lipid nanoparticle vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(33), e2303567120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2303567120>
- Shi, Y., Shi, M., Wang, Y., & You, J. (2024). Progress and prospects of mRNA-based drugs in pre-clinical and clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1-43. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02002-z>

- Shyu, A.-B., Wilkinson, M. F., & Hoof, A. van. (2008). Messenger RNA regulation : To translate or to degrade. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601977>
- Simonsen, J. B. (2024). Lipid nanoparticle-based strategies for extrahepatic delivery of nucleic acid therapies – challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 370, 763-772. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.04.022>
- Singh, M. S., Ramishetti, S., Landesman-Milo, D., Goldsmith, M., Chatterjee, S., Palakuri, R., & Peer, D. (2021). Therapeutic Gene Silencing Using Targeted Lipid Nanoparticles in Metastatic Ovarian Cancer. *Small*, 17(19), 2100287. <https://doi.org/10.1002/smll.202100287>
- Stadler, C. R., Bähr-Mahmud, H., Celik, L., Hebich, B., Roth, A. S., Roth, R. P., Karikó, K., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2017). Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies. *Nature Medicine*, 23(7), 815-817. <https://doi.org/10.1038/nm.4356>
- Su, K., Shi, L., Sheng, T., Yan, X., Lin, L., Meng, C., Wu, S., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, C., Wang, Z., Qiu, J., Zhao, J., Xu, T., Ping, Y., Gu, Z., & Liu, S. (2024). Reformulating lipid nanoparticles for organ-targeted mRNA accumulation and translation. *Nature Communications*, 15(1), 5659. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50093-7>
- Swingle, K. L., Hamilton, A. G., & Mitchell, M. J. (2021). Lipid Nanoparticle-Mediated Delivery of mRNA Therapeutics and Vaccines. *Trends in Molecular Medicine*, 27(6), 616-617. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.03.003>
- Tanaka, H., Watanabe, A., Konishi, M., Nakai, Y., Yoshioka, H., Ohkawara, T., Takeda, H., Harashima, H., & Akita, H. (2018). The delivery of mRNA to colon inflammatory lesions by lipid-nano-particles containing environmentally-sensitive lipid-like materials with oleic acid scaffolds. *Heliyon*, 4(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00959>
- Tanguay, R. L., & Gallie, D. R. (1996). Translational Efficiency Is Regulated by the Length of the 3' Untranslated Region. *Molecular and Cellular Biology*, 16(1), 146-156. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.1.146>
- Tilstra, G., Couture-Sénécal, J., Lau, Y. M. A., Manning, A. M., Wong, D. S. M., Janaeska, W. W., Wuraola, T. A., Pang, J., & Khan, O. F. (2023). Iterative Design of Ionizable Lipids for Intramuscular mRNA Delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 145(4), 2294-2304. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10670>
- University Hospital Tuebingen. (2007). *Induction of Specific Immune Responses Against Melanoma-Associated Antigens in Vivo by Intradermal Vaccination With Stabilized Tumor mRNA - a Clinical Phase I/II Trial* (Clinical trial registration No. NCT00204607). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT00204607](https://clinicaltrials.gov/study/NCT00204607)
- Vavilis, T., Stamoula, E., Ainatzoglou, A., Sachinidis, A., Lamprinou, M., Dardalas, I., & Vizirianakis, I. S. (2023). mRNA in the Context of Protein Replacement Therapy. *Pharmaceutics*, 15(1), 166. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010166>
- Verbeke, R., Hogan, M. J., Loré, K., & Pardi, N. (2022). Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 55(11), 1993-2005. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.014>
- Vlatkovic, I. (2021). Non-Immunotherapy Application of LNP-mRNA : Maximizing Efficacy and Safety. *Biomedicines*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050530>
- Volkhin, I. A., Paremskaia, A. Iu., Dashian, M. A., Smeshnova, D. S., Pavlov, R. E., Mityaeva, O. N., Volchkov, P. Yu., & Deviatkin, A. A. (2025). Selection of UTRs in mRNA-Based Gene Therapy and Vaccines. *Biochemistry (Moscow)*, 90(6), 725-753. <https://doi.org/10.1134/S0006297924604659>

- Wang, S., Guo, B., Wang, H., & Yang, F. (2024). The optimization strategies of LNP-mRNA formulations : Development and challenges for further application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 95, 105547.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105547>
- Wang, Y.-S., Kumari, M., Chen, G.-H., Hong, M.-H., Yuan, J. P.-Y., Tsai, J.-L., & Wu, H.-C. (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>
- Wang, Z.-R., Li, L.-T., Xiong, F.-F., Zhao, L.-B., Mao, H., Zhu, M.-Y., Su, S.-Y., Guo, Z.-Y., & He, C. (2025). Preparation, and enzymatic activity analysis of an engineered capping enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 188, 110640.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2025.110640>
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, 247(4949), 1465-1468.
<https://doi.org/10.1126/science.1690918>
- Wu, J., Wu, W., Zhou, B., & Li, B. (2024). Chimeric antigen receptor therapy meets mRNA technology. *Trends in Biotechnology*, 42(2), 228-240.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.08.005>
- Xia, X. (2021). Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Vaccines*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070734>
- Xu, Y., Ma, S., Cui, H., Chen, J., Xu, S., Gong, F., Golubovic, A., Zhou, M., Wang, K. C., Varley, A., Lu, R. X. Z., Wang, B., & Li, B. (2024). AGILE platform : A deep learning powered approach to accelerate LNP development for mRNA delivery. *Nature Communications*, 15(1), 6305. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50619-z>
- Yamaguchi, K., Nakagawa, I., Sekine, M., Hata, T., Shimotohno, K., Hiruta, M., & Miura, K. (1984). Chemical synthesis of the 5'-terminal part bearing cap structure of messenger RNA of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) : M 7 G 5 ' pppAmpG and m 7 G 5 pppAmpGpU. *Nucleic Acids Research*, 12(6), 2939-2954. <https://doi.org/10.1093/nar/12.6.2939>
- Yap, T. A., Papadopoulos, K. P., Garralda, E., Spira, A. I., Calvo, E., Saavedra, O., Ramon-Patino, J. L., Stadler, C., Koseoglu, S., Chang, P. K., Ellinghaus, U., Lindemann, C., Ewen, E.-M., Zyto, E., Zamorski, A., Martinez, J. L., De Mattos-Arruda, L., Celik, I., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2023). A phase I/II dose escalation trial with expansion cohorts to evaluate safety and preliminary efficacy of BNT142 in patients with prospectively confirmed claudin 6-positive solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 41(16_suppl), TPS2669-TPS2669.
https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.TPS2669
- Žak, M. M., & Zangi, L. (2025). Clinical development of therapeutic mRNA applications. *Molecular Therapy*, 33(6), 2583-2609. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.03.034>
- Zhang, H., Liu, H., Xu, Y., Huang, H., Liu, Y., Wang, J., Qin, Y., Wang, H., Ma, L., Xun, Z., Hou, X., Lu, T. K., & Cao, J. (2025). Deep generative models design mRNA sequences with enhanced translational capacity and stability. *Science*, 0(0), eadr8470.
<https://doi.org/10.1126/science.adr8470>
- Zhang, J., Liu, Y., Li, C., Xiao, Q., Zhang, D., Chen, Y., Rosenecker, J., Ding, X., & Guan, S. (2023). 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, R., El-Mayta, R., Murdoch, T. J., Warzecha, C. C., Billingsley, M. M., Shepherd, S. J., Gong, N., Wang, L., Wilson, J. M., Lee, D., & Mitchell, M. J. (2021). Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver. *Biomaterials Science*, 9(4), 1449-1463. <https://doi.org/10.1039/D0BM01609H>
- Zheng, Y., & VanDusen, N. J. (2023). Massively Parallel Reporter Assays for High-Throughput In Vivo Analysis of Cis-Regulatory Elements. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 10(4), 144. <https://doi.org/10.3390/jcdd10040144>
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., ... MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), 111-114. <https://doi.org/10.1038/nature04688>

Annexes – Congrès, publications et brevets

- Poster scientifique : **SF Nano Annual Meeting**, Décembre 2022, Strasbourg, France.
- Poster scientifique : **35ème colloque Biotechnocentre**, Octobre 2023, Nouan le Fuzelier, France.
- Poster scientifique : **The 11th International mRNA Health Conference**, Novembre 2023, à Berlin, Allemagne.

1. Medjmedj, A., Ngalle-Loth, A., Clemençon, R., Hamacek, J., Pichon, C., & Perche, F. (2022). In cellulo and in vivo comparison of cholesterol, beta-sitosterol and dioleoylphosphatidylethanolamine for lipid nanoparticle formulation of mRNA. *Nanomaterials*, 12(14), 2446.

2. Medjmedj, A., Genon, H., Hezili, D., Loth, A. N., Clemençon, R., Guimpied, C., ... & Perche, F. (2025). Evaluation of synthetic mRNA with selected UTR sequences and alternative poly (A) tail, in vitro and in vivo. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 36(3).

3. Loth, A. N., Maroquenne, M., **Medjmedj, A.**, Coste, F., Bizien, T., Pichon, C., ... & Perche, F. (2025). Structural and functional characterization of a histidylated liposome for mRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 379, 164-176.

4. Acide nucléique synthétique et ses utilisations thérapeutiques, **Medjmedj Ayoub**, Ngalle-Loth A, Perche F, WO2024231621.

5. Application of Synchrotron Radiation Circular Dichroism for mRNA structural analysis. **Medjmed Ayoub**, Hamacek J, Wien F, Perche F, In *Methods in Molecular Biology, RNA Spectroscopy: Methods and Protocols*, Second Edition, Editors: Frank Wien & Véronique Arluison.

Évaluation de l'ARN messenger synthétique délivré par des nanoparticules lipidiques : impact des lipides helper et des éléments UTR/poly(A) sur l'efficacité d'expression

Résumé :

L'ARN messenger (ARNm) est apparu comme une plateforme prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments. L'efficacité de la technologie ARNm dépend à la fois de la délivrance efficace et de la traduction efficace des molécules d'ARNm. Malgré le succès remarquable des vaccins à ARNm contre le SARS-CoV-2, des progrès restent nécessaires pour améliorer les systèmes de délivrance et la conception de la séquence d'ARNm, en vue d'optimiser l'efficacité des vaccins et thérapies à ARNm. La première partie de cette thèse a porté sur les nanoparticules lipidiques (LNPs) comme vecteurs de délivrance pour l'ARNm synthétique. Trois compositions de LNP, toutes contenant le lipide ionisable D-Lin-MC3 mais différant par la nature du lipide auxiliaire (DSPC/cholestérol, DOPE/cholestérol et DOPE/ β -Sitostérol), ont été comparées in cellulo et in vivo afin d'identifier les lipides auxiliaires les plus efficaces pour la délivrance de l'ARNm. Nos résultats montrent que le choix du lipide auxiliaire influence l'efficacité de la transfection in vivo, et que les formulations contenant du DOPE montrant des performances supérieures. La seconde partie de cette thèse a porté sur l'optimisation des éléments de séquence de l'ARNm. Dans l'objectif d'améliorer la traduction de l'ARNm synthétique, nous avons évalué différentes séquences non traduites (UTRs) et queues poly(A), en utilisant la conception de séquence du vaccin COVID-19 de Pfizer-BioNTech comme référence. Nous avons d'abord évalué six régions 5' UTR (dépendantes ou indépendantes de la coiffe), neuf combinaisons 5' UTR-3' UTR, ainsi qu'une nouvelle queue hétérologue A/G, en modèles cellulaires et in vivo avec la luciférase comme gène rapporteur. Afin de mieux comprendre le mécanisme de traduction des UTRs sélectionnées, nous avons corrélié l'expression de l'ARNm avec la charge ribosomale, la demi-vie de l'ARNm, son immunogénicité et la structure des UTRs. Nos résultats montrent que la queue hétérologue A/G est aussi efficace que la queue utilisée dans le vaccin Pfizer-BioNTech et confirme la grande efficacité du 5' UTR de l' α -globine humaine. De plus, le potentiel des 3' UTRs VP6 et SOD a été révélé. Nous avons validé ces résultats en utilisant un ARNm codant la protéine Spike du SARS-CoV-2, formulé en LNP pour l'immunisation murine. Globalement, les 3' UTRs sélectionnées et la queue hétérologue A/G offrent un fort potentiel comme nouveaux éléments pour la conception de l'ARNm thérapeutique. En résumé, nos travaux soulignent l'importance du choix du lipide auxiliaire dans la formulation des LNP, et démontrent le rôle déterminant des éléments de séquence d'ARNm, notamment les régions 5' UTR, 3' UTR et la queue poly(A), dans l'amélioration de l'efficacité des traitements à base d'ARNm.

Mots clés : Systèmes de délivrance, LNP, ARNm, UTR, vaccin et thérapie à base d'ARNm

Evaluation of synthetic messenger RNA delivered by lipid nanoparticles: impact of helper lipids and UTR/poly(A) elements on expression efficacy

Summary :

Messenger RNA (mRNA) has emerged as an attractive platform for novel drug development. The efficacy of mRNA technology depends on both the efficient delivery and effective translation of mRNA molecules. Despite the remarkable success of mRNA vaccines against SARS-CoV-2, there is still much work to be done to improve delivery systems and mRNA sequence design in order to achieve high efficacy for mRNA vaccines and therapeutics. The first part of this thesis focused on lipid nanoparticles (LNPs) as delivery vehicles for synthetic mRNA. Three LNPs compositions, all containing the ionizable lipid D-Lin-MC3 but differing in their helper lipid composition (DSPC/cholesterol, DOPE/cholesterol and DOPE/ β -Sitosterol) were compared in cellulo and in vivo to identify the most effective auxiliary lipids for mRNA delivery. Our results showed that the choice of helper lipid does influence in vivo transfection efficiency, with formulations containing DOPE exhibiting superior performance. The second part of this thesis focused on the optimization of mRNA sequence elements. Intending to improve the translation of synthetic mRNA, we evaluated various untranslated regions (UTRs) and tail designs, using Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine sequence architecture as a reference. First, we screened six 5' UTRs (cap-dependent/independent), evaluated nine 5' UTR-3' UTR combinations, and a novel heterologous A/G tail in cell models, and in vivo using luciferase as a reporter gene. Then, to decipher the translation mechanism of selected UTRs, we correlated mRNA expression with ribosome load, mRNA half-life, mRNA immunogenicity, and UTR structures. Our results showed that the heterologous A/G tail introduced is as potent as the Pfizer-BioNTech tail and confirmed the high potency of the human α -globin 5' UTR. They also revealed the potential of the VP6 and SOD 3' UTRs. We validated our results using mRNA encoding the SARS-CoV-2 spike protein formulated as lipid nanoparticles (LNPs) for mouse immunization. Overall, the selected 3' UTRs and heterologous A/G tail have great potential as new elements for therapeutic mRNA design. In summary, our findings emphasize the critical role of helper lipid selection in LNP formulations and demonstrate the significance of mRNA sequence elements including the 5' UTR, 3' UTR, and poly(A) tail in advancing the efficacy of mRNA therapeutics.

Keywords : Delivery Systems, LNPs, mRNA, UTR, mRNA vaccines