



HAL
open science

Formulation et vectorisation d'un ARN messager vaccinal codant l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique)

Anne-Line Coolen

► **To cite this version:**

Anne-Line Coolen. Formulation et vectorisation d'un ARN messager vaccinal codant l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique). Santé. Université de Lyon, 2018. Français. NNT: 2018LYSE1292 . tel-03081175

HAL Id: tel-03081175

<https://theses.hal.science/tel-03081175>

Submitted on 18 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1292

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale EDISS 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Science de la vie, Biologie, Santé

Soutenue publiquement le 10/12/2018, par :

Anne-Line Coolen

**Formulation et vectorisation
d'un ARN messager vaccinal codant
l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de
nanoparticules biodégradables de
poly(acide lactique)**

Devant le jury composé de :

Pr. Thierry DELAIR, IMP, Lyon
Dr. Anne HOSMALIN, Institut Cochin, Paris
Dr. Montserrat PLANA, IDIBAPS – AIDS Research Group, Barcelone
Pr. Guido VANHAM, ITM, Anvers
Dr. Valérie LECOUTURIER, Sanofi Pasteur, Lyon
Dr. Bernard VERRIER, LBTI, Lyon
Dr. Emilie DELAUNE, INMG, Lyon

Président
Rapporteure
Rapporteure
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse
Invitée

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Ce doctorat a été mis en place et soutenu par la Région Auvergne Rhône-Alpes (ARC 1 – Santé). Les travaux ont été réalisés sous la supervision de Dr. Bernard Verrier, dans l'équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » faisant partie de l'UMR 5305 – LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique) à l'IBCP :

Institut de Biologie et Chimie des Protéines

7, passage du Vercors

69007 LYON

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **Dr. Anne Hosmalin, Dr. Montserrat Plana et Pr. Guido Vanham** d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être rapporteur. Je remercie également **Pr. Thierry Delair et Dr. Valérie Lecouturier** d'avoir accepté d'examiner cette thèse et de faire partie du jury de soutenance.*

*Je souhaite également exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, **Dr. Bernard Verrier**, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce doctorat au sein de son équipe et m'a accordé toute sa confiance au cours de ces trois années. Merci pour la grande liberté laissée et les moyens qui m'ont été donnés dans la réalisation de ce projet ainsi que pour les conseils avisés apportés lorsque cela était nécessaire.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier **Dr. Emilie Delaune**, pour m'avoir donné toute sa confiance dès mon stage de master, pour son soutien et ses nombreux conseils tant au niveau professionnel que personnel. Ton aide m'a été très précieuse !*

*Je remercie vivement **Dr. Christophe Guillon et Dr. Yann Leverrier** pour les nombreux conseils et leurs remarques constructives lors de mes comités de suivi de thèse.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de l'IBCP et notamment les doctorants des deux unités. Un merci particulier à **Denis**, pour son aide et humour à tout épreuve, et **Corinne**. Merci pour les bons moments partagés parmi vous. Merci également aux personnels des plateaux techniques qui m'ont beaucoup aidée au cours de ce travail, et notamment au personnel du plateau de cytométrie (**Sébastien et Thibault**).*

*Ces années de thèse n'auraient jamais été les mêmes sans la présence des personnes du laboratoire. Je tiens donc à remercier chaleureusement l'ensemble de l'équipe Verrier. Merci à **Julien et Dominique**, qui m'ont fait confiance dès mon arrivée dans l'équipe ! Merci à **Claire L, Damien, Elise, Evelyne, Naïma, Laetitia, Pierre, Simon, Sofia, Sophie, Ulrich** et la team Adjuvatis : **Charlotte, David et Maxime**. Merci à **Claire M** pour ses petits conseils ! Merci à **Céline C et Céline L** pour leur aide ! Merci à **Agathe**, pour sa bonne humeur ! Merci à **Jean-Yves** pour le gros coup de pouce sur les relectures et pour les nombreux conseils apportés au cours de ce travail et notamment en biologie moléculaire. Merci également à **Laetitia** pour ses relectures et son aide sur les manip poissons de dernières minutes. Un très grand merci à **Perrine** pour sa gentillesse, sa patience ainsi que pour tout son soutien et son aide dans la réalisation de ce projet !*

*Je tiens aussi à remercier tous les anciens doctorants ou nouveaux arrivants pour leur bonne humeur : **Anne-Sophie, Julien, Gina, Morgane, Alice, Capucine, Myriam, Alix, Sophie, Alex, David, Anne-Lise, Stavroula, Mehwish et Sergio**. Merci également à **Lam, Eugénie, Gwenaëlle et Bérénice**. Je n'aurai pas espéré meilleurs stagiaires que vous pour m'aider dans la réalisation de ce travail. Merci également à tous les autres stagiaires passés par le laboratoire pour votre bonne humeur quotidienne et votre fraîcheur.*

*Mille mercis à **Alice**, un soutien hors-norme au-delà du laboratoire, **Laetitia**, confidente de tous les jours, et **Anne-Lise**, pour sa bonne humeur ! Au cours du temps vous êtes devenues bien plus que des collègues et cette thèse n'aurait jamais été la même sans votre présence ! Merci à vous les filles !*

Je souhaite aussi remercier mes amis, et notamment Lucie, Alysée et la bande BBDP(G), pour leurs encouragements mais surtout pour tous nos petits moments partagés !

*Merci à **Nathalie**, **Philippe** et **Lisa** pour les bons moments partagés ensemble ainsi que votre soutien tout au long de cette thèse.*

*Je tiens à remercier du fond du cœur toute ma famille pour m'avoir soutenue et encouragée chaque jour mais aussi pour m'avoir motivée lors des moments difficiles. Un très grand Merci à toi **Maman** et à toi **Philippe**, mais aussi à **Julie** et **Guillaume**. Et enfin mes derniers remerciements vont à toi, **Simon**. Merci pour ta présence, ta patience et ton amour au quotidien !*

Résumé

Formulation et vectorisation d'un ARN messager vaccinal codant l'antigène Gag du VIH-1 à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly(acide lactique)

Le développement de vaccins à ARNm est en plein essor dans le domaine de la vaccinologie. Un des défis majeurs de ces approches est de parvenir à transporter et délivrer les ARNm dans le cytoplasme des cellules dendritiques (DC) pour permettre la production d'antigène et l'activation des réponses immunitaires.

L'objectif de ce travail a porté sur la conception et l'évaluation de nouvelles stratégies de vectorisation des ARNm par des nanoparticules de poly(acide lactique) (NP-PLA). Une stratégie basée sur l'adsorption des ARNm à la surface des NP-PLA par l'intermédiaire du LAH4-L1, un peptide cationique amphipathique, a été développée. Des polyplexes formés suite à la condensation de l'ARNm par le LAH4-L1 ont été adsorbés sur les NP-PLA pour former des nanocomplexes. L'intérêt des polyplexes et nanocomplexes pour le ciblage des DC et l'activation des réponses immunitaires *in vitro* a été évalué. Dans des tests de transfection, ces formulations ont induit une expression efficace d'ARNm modèles dans des DC. La présence des NP-PLA dans les formulations semble favoriser l'expression des ARNm. Le traitement avec des inhibiteurs a révélé que les polyplexes et nanocomplexes semblent internalisés par phagocytose et endocytose clathrine-dépendante, et s'échappent des endosomes par un mécanisme dépendant de la pompe à protons v-ATPase. Suite à la transfection de DC dérivées de monocytes (moDC), nous avons montré que nos formulations stimulent les récepteurs de l'immunité innée et induisent une réponse pro-inflammatoire. Cette activation est associée à la maturation des moDC, à la présentation de peptides antigéniques sur le CMH-I et -II et à la sécrétion de cytokines et chimiokines impliquées dans l'immunité adaptative.

Ces données soulignent l'intérêt des NP-PLA associées au LAH4-L1 pour vectoriser des ARNm, cibler des DC et activer les réponses immunitaires. Dans le contexte du VIH-1, ce type de réponse pourrait aider le système immunitaire à contrôler la charge virale.

Mots-clés : Vaccins à ARNm, nanoparticules, formulation, cellules dendritiques, réponses immunitaires

Summary

Formulation and vectorization of messenger RNA vaccine encoding HIV Gag antigen using biodegradable poly(lactic acid) nanoparticles.

mRNA-based vaccines currently raise a growing interest in vaccinology. However, the transport and delivery of mRNAs to DC cytoplasm in order to induce antigen production and immune responses remains challenging.

The objective of this thesis concerns the design and evaluation of novel strategies to vectorize vaccine mRNAs by poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs). We developed a strategy based on mRNA adsorption onto PLA-NPs using, as intermediate, LAH4-L1, an amphipathic cationic peptide. To do this, mRNAs were condensed by LAH4-L1 to form polyplexes which was then adsorbed onto PLA-NPs in a second step to form nanocomplexes. The LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes ability to target DCs and induce immune responses *in vitro* was evaluated. We showed that formulations induce an efficient transfection of mRNA in DCs *in vitro*. The addition of PLA-NPs in formulations seems to increase sustained expression of mRNAs. DC treatment by inhibitors revealed that polyplexes and nanocomplexes are taken up by phagocytosis and clathrin-dependent endocytosis, and escape endosomes by a v-ATPase-dependent mechanism. Transfection of monocyte-derived DCs (moDCs) showed that LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes trigger innate-sensing activation with pro-inflammatory responses. This activation is associated with moDCs maturation, MHC-I and MHC-II presentation, and the secretion cytokines and chemokines involved in adaptive immunity.

These data highlight the interest of these new platform formulations to vectorize mRNAs, target DCs and induce immune responses, which in the context of HIV-1, could help the immune system to control the viral load.

Key words: mRNA vaccine, nanoparticles, formulation, dendritic cells, immune response

Table des matières

Etude bibliographique	1
I. De la vaccination courante aux vaccins à ARNm	3
1. Histoire de la vaccination	3
2. Le système immunitaire au centre du mécanisme de la vaccination	4
3. Des vaccins traditionnels aux vaccins acides nucléiques	7
4. De nouvelles formulations vaccinales : les vaccins à acide nucléique	10
5. Les ARNm : biomolécules de choix pour le développement de vaccins	12
1. Construction et production des ARNm antigéniques	13
a. Design des ARNm	13
b. ARNm non-réplicatifs et auto-réplicatifs	14
c. Production des ARNm	16
2. Capacité immunostimulante des ARNm	17
3. Optimisation des ARNm vaccinaux	20
4. Complexité de délivrance des ARNm	25
II. Le ciblage des DC par les vaccins à ARNm	27
1. Les cellules dendritiques : cibles de choix en vaccination	27
1. Origine et sous-populations	27
2. Fonctions des cellules dendritiques	29
a. Voies d'endocytoses des antigènes par les DC	31
b. Induction des réponses immunitaires par les ARNm vaccinaux dans les DC	34
2. Stratégies de délivrance des ARNm aux cellules dendritiques	35
1. Les méthodes de délivrance des ARNm	36
a. Délivrance des ARN messagers nus	36
b. Méthodes physiques de délivrance des ARNm	37
c. Couplage à la protamine et peptides cationiques	38
d. Les vecteurs lipidiques	39
e. Les nanovecteurs polymériques	42
2. Administration des ARNm aux cellules dendritiques	47
a. Chargement des DC <i>ex vivo</i>	47
b. Administration directe des vaccins à ARNm <i>in vivo</i>	50
3. Fonctionnalisation des vecteurs pour le ciblage des cellules dendritiques	55
3. Les nanoparticules de poly(acide lactique) pour le ciblage des cellules dendritiques	56
1. Synthèse et caractérisation des particules de PLA	57
2. Avantages des NP-PLA en vaccination et pour le ciblage des DC	59
III. Vaccination dans le cas du VIH-1	61
1. Le VIH-1	61

1.	Origine _____	61
2.	Organisation génomique et structurale du VIH-1 _____	62
3.	Réplication du virus _____	64
4.	Pathogénicité du VIH-1 _____	65
2.	Développement de thérapies contre le VIH-1 _____	67
1.	Les thérapies antirétrovirales _____	67
2.	Analyses des corrélats de protection pour le développement de vaccins prophylactiques et thérapeutiques _____	68
3.	Stratégies de vaccination contre le VIH-1 _____	71
a.	Développement de vaccins prophylactiques _____	71
b.	Développement de vaccins thérapeutiques anti VIH-1 _____	74
IV.	Projet d'étude _____	77
Résultats _____		81
I.	Développement d'une stratégie pour la vectorisation d'ARNm par les NP-PLA _____	83
1.	Encapsulation des ARNm dans les NP-PLA _____	85
1.	Introduction _____	85
2.	Matériels et méthodes _____	85
a.	Production des ARNm _____	85
b.	Synthèse des nanoparticules _____	85
c.	Caractérisation des NP-PLA _____	86
d.	Dosage des ARNm _____	86
3.	Résultats _____	86
a.	Les ARN ne peuvent pas être encapsulés seuls dans les NP-PLA _____	86
b.	L'ajout d'additif n'améliore pas la capacité d'encapsulation des ARN _____	87
4.	Discussions _____	87
2.	Adsorption <i>via</i> l'interaction naturelle entre la protéine Rev et la séquence ARNm RRE _____	89
1.	Introduction _____	89
2.	Matériels et méthodes _____	91
a.	Production des ADN plasmidiques _____	91
b.	Production des ARNm _____	91
c.	Protéines et peptides Rev utilisés _____	92
d.	Formulation des ARNm sur les NP-PLA par l'intermédiaire des peptides Rev _____	92
e.	Caractérisation des formulations _____	93
f.	Tests de fonctionnalité des formulations en cellules _____	93
3.	Résultats _____	94
a.	Design d'un ARNm antigénique fonctionnel portant la séquence d'ARN RRE _____	94
b.	Couplage des ARNm portant la séquence RRE au NP-PLA par l'intermédiaire des peptides Rev en couche par couche _____	95

c.	Adsorption du complexe peptide / ARNm sur les NP-PLA	102
4.	Discussions	104
3.	Adsorption <i>via</i> des protéines et peptides cationiques	107
1.	Introduction	110
2.	Materials and methods	112
a.	Production of <i>in vitro</i> transcribed mRNA	112
b.	Cationic intermediates	112
c.	Nanocomplexes preparation:	112
d.	Nanocomplexes characterization	113
e.	<i>In vitro</i> expression in cell lines	113
f.	<i>In vitro</i> cytotoxicity analysis	114
g.	Functionality and cytotoxicity analysis in zebra fish embryo	114
h.	Statistical Analysis	114
3.	Results	115
a.	Vectorization of mRNA onto PLA-NP using poly-L-lysine and DGL	115
b.	Vectorization of mRNA using protamine as cationic intermediate	119
c.	mRNA vectorization strategy using cell penetrating peptides	121
4.	Discussions and conclusions	126

II. Evaluation de l'efficacité des formulations pour l'expression des ARNm et l'activation de réponses immunitaires *in vitro* **131**

1.	Introduction	134
2.	Materials and methods	136
a.	Production of <i>in vitro</i> transcribed mRNA	136
b.	Production of fluorescent labeled mRNA	136
c.	Polyplexes and nanocomplexes preparation and characterization	137
d.	Expression efficiency analysis	137
e.	Stability of formulations	138
f.	Cytotoxicity of formulations	138
g.	Endocytosis mechanisms analysis	139
h.	Endosome escape evaluation	139
i.	Immunostaining of moDCs	139
j.	Determination of innate immune-stimulatory activity	140
k.	Preparation and stimulation of human monocyte-derived DCs	140
l.	Real-time qPCR analyses	141
m.	Quantification of cytokines	141
n.	Statistical Analysis	141
3.	Results	141
a.	mRNAs can be associated onto PLA-NPs <i>via</i> cationic peptides	141

b.	LAH4-L1-based formulations allow efficient mRNA uptake and protein expression in dendritic cells	144
c.	mRNA vaccine formulations enter in dendritic cells through clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis	146
d.	Endosomal escape is needed to induce efficient translation	147
e.	mRNAs in LAH4-L1-based formulations induce an innate immune-stimulatory activity through PRR activation	148
f.	LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA complexes promote moDC maturation	149
4.	Discussion	153
5.	Conclusions	157
g.	Les ARNm sont exprimés dans les moDC de manière moins efficace que dans les DC2 .4	161
h.	Les formulations présentent une toxicité à forte dose	162

III. Mise en place des outils pour l'analyse *in vivo* 165

1.	Evaluation de paramètres influant sur la prise en charge des formulations pour une application <i>in vivo</i>	165
1.	Introduction	165
2.	Matériels et méthodes	166
a.	Production des ARNm	166
b.	Formation des complexes	166
c.	Quantification de l'expression de l'ARNm	166
d.	Analyse de la protection des ARNm	167
e.	Analyse de la cytotoxicité sur les embryons de poisson zèbre	167
f.	Analyse de la fonctionnalité après injection chez la larve de poisson zèbre	168
g.	Analyses statistiques	168
3.	Résultats	169
a.	Les formulations en présence de sérum ne permettent pas l'expression de l'ARNm	169
b.	La présence de sérum conduit à une dégradation rapide des ARNm	170
c.	Le LAH4-L1 induit une toxicité sur les embryons de poisson zèbre et une mortalité à forte dose chez les larves	171
d.	Les formulations basées sur l'utilisation de LAH4-L1 ne permettent pas l'expression de l'ARNm vectorisé chez les larves de poisson zèbre	173
4.	Discussions	174
2.	Projet expérimental pour l'évaluation de l'intérêt des formulations chez les souris dans le cas de la protéine gag	177

Discussion générale et perspectives 181

1.	Influence de la stratégie de vectorisation pour la délivrance des ARNm par les NP-PLA	183
2.	Influence du format de délivrance des ARN messagers	186
3.	Influence de l'antigène vaccinal dans l'induction de réponses immunitaires	189
4.	Influence de la concentration d'ARNm administrée	191
5.	Influence de la structure des ARNm pour l'induction de réponses immunitaires	192

<i>Conclusions générales</i>	195
<i>Annexes</i>	199
<i>Références bibliographiques</i>	204

Abréviations

Ac		Anticorps
ADN	<i>DNA</i>	Acide DésoxyriboNucléique
ADCC		Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Ac
ARN	<i>RNA</i>	Acide RiboNucléique
ARNm	<i>mRNA</i>	Acide RiboNucléique messenger
bnNAc	bnNAbs	Anticorps neutralisants à large spectre
CA		Protéine de la capside du VIH-1
CCR		Récepteur chimiokines C-C
CMH-I	<i>MHC-I</i>	Complexe Majeur d’Histocompatibilité de type 1
CMH-II	<i>MHC-II</i>	Complexe Majeur d’Histocompatibilité de type 2
CPA	<i>APC</i>	Cellules Présentatrices d’Antigène
CXCR		Récepteur chimiokines C-X-C
DAMP		Motif moléculaire associé aux dangers
db	<i>ds</i>	Double brin
DC		Cellules Dendritiques
DC-SIGN		<i>DC-Specific intracellular adhesion molecule 3 Grabbing Non-intergrin</i>
DOPE		Lipide neutre : dioleoyl-phosphatidyl-éthanolamine
DOTAP		Lipide cationique : 1,2-dioleoyl-3-triméthylamonium-propane
EC		Elite controllers
eGFP		Enhanced Green Fluorescent Protein
EMA		Agence européenne du médicament
ENI		Exposés Non Infectés
Env		Protéine d’enveloppe du VIH-1
FDA		<i>Food and Drug Administration</i>
Gag		Protéine ou ARNm gag du VIH-1 : <i>Group specific Antigen</i>
GM-CSF		<i>Granulocyte and Macrophage Colony Stimulation Factor</i>
HLA		<i>Human Leucocytes antigen</i>
HxB2		Souche du VIH-1 HxB2 humaine
IFN		Interféron
IL		Interleukine
IP		Indice de Polydispersité
kb		kilo base
kDa		Kilo Dalton
LT		Lymphocyte T
LTC	<i>CTL</i>	Lymphocyte T cytotoxique
LPS		Lipopolysaccharide
LTNP		<i>Long Term Non-Progressors</i>
LTS		<i>Long Term Survivors</i>
MA		Protéine de matrice du VIH-1

moDC		Monocytes dérivés en cellules dendritiques
NC		Nucléocapside
Nef		<i>Negative factor</i>
NF-κB		Nuclear Factor of κ Ig-chain in B lymphocytes
NK		Cellules Natural Killer
NOD		<i>Nucleotide oligomerization domain receptors</i>
NP		Nanoparticules
NP-PLA	<i>PLA-NP</i>	Nanoparticules de Poly(Acide Lactique)
PAMP		Motif moléculaire associé aux pathogènes
PEG		Polyéthylène glycol
PEI		Polyéthylène imine
PIC		Complexe de pré-intégration chez les lentivirus
PBS		Phosphate-Buffered Saline
PLA		Poly(Acide Lactique)
Pol		Polyprotéine de la protéase du VIH-1
PRR		<i>Pattern Recognition Receptor</i>
Rev		Protéine de régulation du VIH-1
RRE		Rev Responsive Element
RT		Transcriptase inverse
sb	<i>ss</i>	Simple brin
SIDA	<i>AIDS</i>	Syndrome de l'Immunodéficience Humaine
siARN		Petit ARNm interférent
VIS	<i>SIV</i>	Virus de l'Immunodéficience Simienne
Tat		Protéine Trans-activatrice de la transcription du VIH-1
T-CD4+		Lymphocytes T auxiliaires (exprimant CD4)
T-CD8+		Lymphocytes T auxiliaires (exprimant CD8)
TCR		Récepteur des cellules T
TGF-β		Facteur de croissance transformant-β
Th		T helper
TLR		Récepteur <i>Toll-like</i>
TNF		Facteur de nécrose tumorale
Treg		Lymphocyte T régulateurs
TRIF		<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
3' UTR		Région 3' non traduite
5' UTR		Région 5' non traduite
Vif		Facteur viral de l'infection du VIH-1
VIH	<i>HIV</i>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLP		Virus-Like Particle
Vpr		Protéine virale R du VIH-1
Vpu		Protéine virale U du VIH-1

Liste des illustrations

Figure 1 : Vaccination contre la variole par le Docteur Edward Jenner en 1796.	3
Figure 2 : Activation du système immunitaire lors de la vaccination.	4
Figure 3 : Activation de la réponse humorale par les cellules dendritiques.	6
Figure 4 : Réponse primaire et secondaire face à un même antigène.	7
Figure 5 : Equilibre entre immunogénicité et sureté des vaccins en fonction de leur niveau de sophistication.	8
Figure 6 : Chronologie de développement des vaccins conventionnels.	9
Figure 7 : Principe de la vaccination à ADN.	11
Figure 8 : Principe de la vaccination à ARNm.	12
Figure 9 : Structure de l'ARNm antigénique.	14
Figure 10 : Comparaison de structure des ARNm non réplicatifs et auto-réplicatifs.	15
Figure 11 : Activation des PRR par les ARNm antigéniques.	18
Tableau I : Modifications recommandées pour un vecteur optimal.	25
Figure 12 : Sous-populations et phénotypes de DC chez l'Homme.	28
Figure 13 : Etats de maturation fonctionnels des cellules dendritiques.	30
Figure 14 : Signaux d'activation des lymphocytes T naïfs par les DC.	31
Figure 15 : Voie d'endocytose des antigènes par les cellules dendritiques.	32
Figure 16 : Induction de la réponse immunitaire adaptative par les vaccins à ARNm dans les DC.	34
Figure 17 : Approches majeures de délivrance des ARNm pour le ciblage des cellules dendritiques.	36
Figure 18 : Structure chimique du DOTMA et du DOTAP.	40
Figure 19 : Représentation schématique des liponanoparticules (LNP).	41
Figure 20 : Structure chimique du PEI linéaire et branché.	43
Figure 21 : Représentation schématique des nanomicelles et des dendrimères.	45
Tableau II : Principales stratégies de délivrance des ARNm in vivo.	46
Tableau III : Principaux essais cliniques utilisant la technique de chargement des DC ex vivo	48
Tableau VI : Principaux essais cliniques réalisés par administration directe des ARNm	54
Figure 22 : Synthèse du PLA par polymérisation par ouverture de cycle à partir du lactide.	57
Figure 23 : Procédé de synthèse des nanoparticules de PLA par nanopréciptation.	58
Figure 24 : Organisation du génome du virus VIH-1.	62
Figure 25 : Structure de virus du VIH-1.	63
Figure 26 : Cycle de réplication du virus du VIH-1.	64
Tableau V : Corrélats de protection contre le VIH-1.	70
Figure 27 : Principales avancées thérapeutiques contre le VIH-1.	71
Tableau VI : Efficacité des principaux essais cliniques terminés dans le cadre de vaccins anti-VIH	72
Figure 28 : Procédé d'encapsulation et d'adsorption d'antigènes et/ou de molécules immunostimulantes dans les NP-PLA.	84
Tableau VII : Propriétés des NP-PLA encapsulant les ARN seuls.	86
Tableau VIII : Propriétés des NP-PLA encapsulant les ARNm en présence de phosphatidylcholine.	87

Figure 29 : Fonction de la protéine Rev pour l'export des ARN lors la réplication du VIH-1	89
Figure 30 : Séquences des peptides Rev et de l'ARN RRE nécessaires à l'interaction entre les deux composants.	90
Figure 31 : Structure et fonctionnalité de l'ARNm antigénique portant la séquence non-codante RRE.	95
Figure 32 : Schéma de la stratégie de vectorisation basée sur l'adsorption en couche par couche des composants.	96
Figure 33 : Détermination de la quantité optimale de peptide Rev Min et Rev RSG dans les formulations.	97
Figure 34 : Détermination de la quantité optimale de NP-PLA dans les formulations.	98
Figure 35 : Détermination de la durée optimale des formulations en tampon carbonate pH 11.	99
Figure 36 : Adsorption des ARNm sur les complexes NP-PLA / Peptide Rev Min.	101
Figure 37 : Schéma de stratégie de vectorisation basée sur la formation d'un pré-complexe peptide-ARN.	102
Figure 38 : Caractérisation des complexes ARN/peptide Rev libres ou liés au NP-PLA.	103
Figure 39 : Fonctionnalité des formulations dans les cellules dendritiques DC2.4.	104
Figure 40: mRNA adsorption onto PLA-NP through Poly-L-Lysine _{30 or 100} and DLG.	116
Figure 41: mRNA expression in zebra fish embryos and in mouse dendritic SRDC cells through PLL- and DGL-based complexes.	118
Figure 42: mRNA adsorption onto PLA-NP through protamine as intermediate.	120
Figure 43: mRNA adsorption onto PLA-NP through cationic peptides as intermediate.	122
Figure 44: mRNA/cationic peptide complexes adsorption onto PLA-NP.	124
Figure 45: mRNA adsorption onto PLA-NP through cationic peptides as intermediate.	126
Figure 46: mRNA can be vectorized by PLA-NPs using cationic peptides as intermediates.	142
Figure 47: LAH4-L1-based formulations allow efficient mRNA expression in DC2.4 cells in vitro.	145
Figure 48: Clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis are involved in complexes uptake by DC2.4 cells.	146
Figure 49: Endosomal escape is essential for mRNA expression in DC2.4 cells.	147
Figure 50: mRNA complexes stimulate the innate immunity through PRR activation.	148
Figure 51: LAH4-L1/gag-mRNA based formulations induce moDC activation and maturation.	150
Figure 52: LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA promote cytokine and chemokine secretion by moDCs.	152
Figure 53: Model for trafficking of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA into DCs to induce immune responses.	156
Table IX: Mode of action and working concentration of chemical inhibitor used.	159
Figure S1: Sequence and predictive structure of RALA, LAH4 and LAH4-L1 peptides.	159
Figure S2: Characterization of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA by DLS.	160
Figure S3: Stability of PLA-NP/LAH4-L1/mRNA formulation at 4°C over 21 days.	160
Figure S4: LAH4-L1 formulations retain ability to the induce efficient mRNA expression in DCs after conservation at 4°C for up to 7 days.	161
Figure S5: Expression of gag mRNA in moDCs.	161
Figure S6 : Les polyplexes et les nanocomplexes induisent une faible expression dans les moDC.	162
Figure S7: La cytotoxicité des formulations composées des peptides RALA, LAH4 et LAH4-L1 est proportionnelle à la concentration.	163
Figure S4 : Les formulations basées sur l'utilisation de LAH4-L1 ne sont pas fonctionnelles en présence de sérum.	169
Figure S5 : Les polyplexes LAH4-L1/ARNm et les nanocomplexes PLA-NP/LAH4-L1/ARNm ne permettent pas de protéger les ARNm des dégradations par le sérum.	170

<i>Figure 56 : Le LAH4-L1 présent dans les formulations induit un arrêt de développement et une mortalité sur les embryons de poisson zèbre après 24 h d'immersion.</i>	<i>172</i>
<i>Figure 57 : Le LAH4-L1 induit une mortalité limitée, sans altération du développement, sur les larves de poisson zèbre après immersion pendant 24 h.</i>	<i>173</i>
<i>Figure 58 : Les ARNm vectorisés par les polyplexes et les nanocomplexes ne permettent pas l'expression des ARNm chez des larves de poisson zèbre.</i>	<i>173</i>
<i>Figure 59 : Structure de la protéine gag du VIH-1 et mécanisme de l'auto-assemblage en pseudo-particules virales (VLP).</i>	<i>177</i>
<i>Figure 60 : Organisation des procédures pour l'étude in vivo chez les souris.</i>	<i>178</i>
<i>Tableau X : Comparaison des résultats obtenus avec les différentes stratégies de vectorisation.</i>	<i>184</i>

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- I. De la vaccination courante aux vaccins à ARNm**
- II. Le ciblage des cellules dendritiques pas les vaccins à ARNm**
- III. La vaccination dans le cas du VIH-I**

I. DE LA VACCINATION COURANTE AUX VACCINS A ARNm

1. Histoire de la vaccination

La notion de vaccination remonte à l'Antiquité où des observations ont montré que les personnes atteintes une première fois par une maladie infectieuse ne l'étaient plus lors de la seconde rencontre avec le même pathogène. De ces observations, une technique nommée « variolisation » a été introduite en Afrique, Chine et Inde au 18^{ème} siècle¹. Cette technique consistait en l'inoculation de pus ou de croûtes de personnes infectées par la variole sur la peau ou la cavité nasale de personnes saines. Malgré des protections chez certaines personnes, cette technique donnait des symptômes parfois sévères et induisait la mort de 2 % des patients. En 1796, Edward Jenner, un médecin anglais, inocule la vaccine (virus de la variole bovine) à un enfant, et en démontre l'effet protecteur¹. Le nom de vaccination est donné à cette opération.



Figure 1 : Vaccination contre la variole par le Docteur Edward Jenner en 1796.

Tableau de Gaston Mélingue de 1879

Un siècle plus tard, Louis Pasteur et ses collaborateurs énoncent le principe de la vaccination et en améliorent la technique, en mettant en évidence l'intérêt de virus atténués. En 1885, ils réalisent le premier vaccin atténué humain sur un enfant mordu par un chien enragé. Par la suite, des vaccins contre la tuberculose, la diphtérie et le tétanos puis contre la fièvre jaune et la poliomyélite sont mis au point². Ces vaccins ont permis l'éradication de la variole en 1976 et la diminution drastique des personnes atteintes par la poliomyélite, la rougeole, le tétanos ou encore la diphtérie. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la vaccination permet aujourd'hui de sauver 2 à 3 millions de vies par an.

De nouveaux vaccins doivent encore être développés afin de s'adapter aux particularités des personnes (femmes enceintes, personnes âgées ou immunodéprimées...) ainsi que pour prévenir des pathologies pour lesquelles on ne dispose pas de vaccins ou de vaccins inefficaces (paludisme, VIH), des pathologies émergentes (Zika ou Chikungunya) ou des pathologies sévères sans traitements efficaces (Ebola).

2. Le système immunitaire au centre du mécanisme de la vaccination

La vaccination est un procédé qui consiste à immuniser une personne en lui administrant un agent extérieur, appelé antigène, et à stimuler les défenses naturelles de l'organisme, formées par le système immunitaire. Ce dernier est constitué d'un ensemble d'organes, de cellules et de molécules permettant de préserver l'intégrité de l'organisme. Il est conçu pour identifier les entités étrangères à l'organisme, antigènes, et induire une réponse immunitaire adaptée, en activant les deux types de réponses immunitaires existantes : les réponses immunitaires innée et adaptative (**Figure 2**)³.

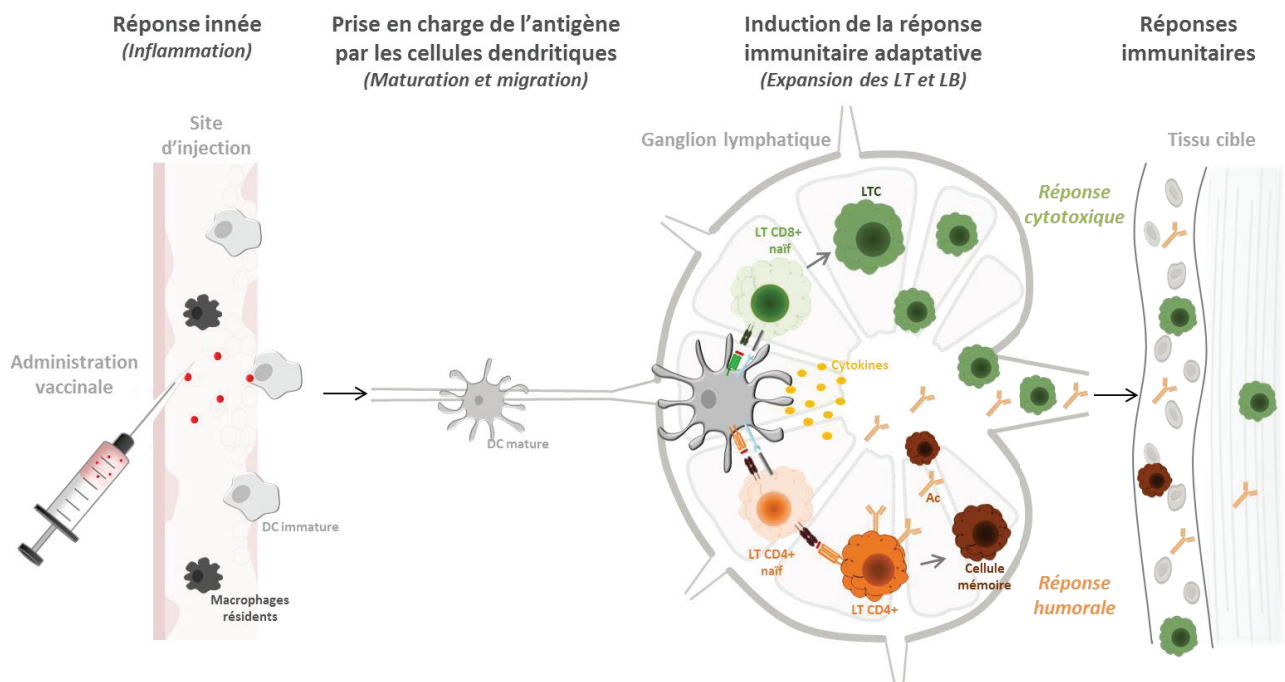


Figure 2 : Activation du système immunitaire lors de la vaccination.

Lors de la vaccination, des antigènes sont libérés sur le site d'injection. Une réponse innée va alors se mettre en place avec le recrutement de cellules résidentes ayant une capacité de phagocytose et notamment de cellules dendritiques (DC). Ces DC, cellules présentatrices de l'antigène majeures et dotées d'un pouvoir de migration, vont mûrir et se déplacer jusqu'au ganglion lymphatique drainant le plus proche. Lors de la maturation, des portions de l'antigène vont être présentées sur les CMH de type I ou II. Cette présentation de l'antigène va permettre l'activation de la réponse humorale avec la différenciation des LT naifs en LT-DC4+ (réponse humorale) ou LT-CD8+ (réponse cytotoxique).

La réponse immunitaire innée représente la première ligne de défense de l'organisme face à un agent infectieux. Elle est mise en place immédiatement lorsqu'un pathogène pénètre les barrières physiques de l'organisme (peau, muqueuses...). Cette immunité innée met en jeu dans un premier

Etude bibliographique

temps les cellules immunitaires phagocytaires résidentes dans les tissus : les macrophages et cellules dendritiques. Elles entrent en contact avec le pathogène et le phagocytent pour permettre sa destruction. Elles ont une variété de récepteurs de types PRR (*Pattern-Recognition Receptor*) capable de reconnaître des signaux de dangers de types PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), des motifs moléculaires typiquement présents sur les pathogènes, ou DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*), des biomolécules de l'hôte typiquement libérées en cas d'attaque⁴. En réponse à ces signaux, les cellules sécrètent des médiateurs de l'inflammation : histamine, cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, etc. Ces derniers vont induire une dilatation des vaisseaux et le recrutement des cellules phagocytaires circulantes (les monocytes, neutrophiles et éosinophiles) impliquées dans l'élimination complète de l'antigène au site d'injection, mais également de cellules favorisant la reconstruction tissulaire. Ceci correspond au phénomène d'inflammation, ressentie chez la personne par l'apparition de rougeur, de douleur et de chaleur au site d'entrée de l'antigène.

L'antigène va ensuite être pris en charge par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), et notamment les cellules dendritiques. Douées d'un fort pouvoir de migration, ces cellules dendritiques (DC) se déplacent jusqu'au ganglion lymphatique drainant le plus proche du site de l'infection. Durant la migration, elles vont acquérir leur maturité en présentant à leur surface des portions de l'antigène sur leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et en exprimant des protéines de co-stimulation (CD80/CD86). Une fois dans les ganglions lymphatiques drainants, où résident lymphocytes naïfs, l'immunité adaptative va être mise en place.

La réponse immunitaire adaptative représente la deuxième ligne de défense de l'organisme. Elle est médiée par de nombreuses molécules et types cellulaires capables de reconnaître les antigènes. Les lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) sont les médiateurs majeurs de cette réponse adaptative.

Lors de la rencontre avec un antigène, les LB vont exprimer à leur surface un anticorps donné spécifique. Ces anticorps sont caractérisés par leur grande diversité (environ 10^{12} séquences différentes)³. L'activation de ces cellules peut se faire par contact direct avec l'antigène, ou par l'intermédiaire des LT. Par la suite, ces lymphocytes vont se diviser et se différencier en plasmocytes producteurs d'un anticorps spécifique de l'antigène et en cellules B mémoires. Les anticorps et cellules mémoires vont être libérés et disséminés dans la circulation sanguine et permettre de répondre plus rapidement en cas de rencontre avec ce même antigène.

Il existe deux types de LT qui sont distinguables par l'expression des protéines CD4⁺ et CD8⁺ à leur surface³.

Les lymphocytes T CD4⁺ ou helper (LT CD4⁺ ou T_H) sont activés uniquement suite à la reconnaissance des fragments antigéniques présentés par les molécules du CMH de type II (CMH-II) des CPA activées *via* leur TCR (*T-Cell Receptor*). Selon la nature de la CPA, les cytokines présentes

Etude bibliographique

lors de la stimulation initiale des T CD4⁺ et l'affinité de liaison entre l'antigène et le CMH-II, la cellule naïve va libérer des médiateurs de l'inflammation (notamment des cytokines) qui vont déterminer la différenciation en une sous population de cellules T CD4⁺ : T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{FH} ou les T_{regs} (**Figure 3**)⁵. Les cellules T_{H1} sont essentielles à la protection contre les pathogènes intracellulaires, à travers la stimulation des LT CD8⁺. Les cellules T_{H2} orchestrent l'élimination de pathogènes extracellulaires et de parasites tels que les helminthes. La réponse T_{H2} est caractérisée par une étroite collaboration entre les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes B dans la lutte contre le même antigène. Les T_{H17} sont impliqués dans les réponses contre les bactéries et champignons extracellulaires *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires alors que les T_{FH} sont nécessaires pour l'activation des lymphocytes B et les T_{regs} pour la régulation des réponses.

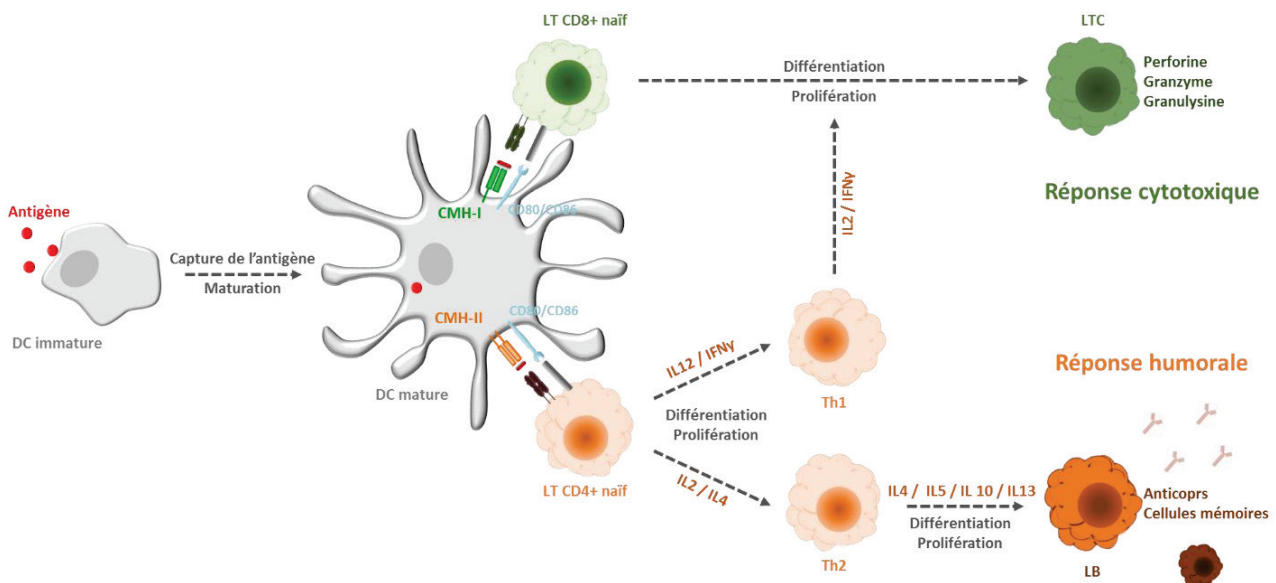


Figure 3 : Activation de la réponse humorale par les cellules dendritiques.

Les DC, CPA professionnelles, vont prendre en charge l'antigène sur le site d'injection. Ce dernier va être phagocyté, apprêté et présenté sur les molécules du CMH-I ou II selon la nature de l'antigène. La DC mature va à son tour stimuler les lymphocytes T naifs, qui en fonction de l'environnement cytokinique vont induire une réponse cytotoxique ou humorale.

Les lymphocytes T CD8⁺ ou cytotoxiques (LT CD8⁺ ou LTC) sont activés uniquement suite à la reconnaissance des fragments antigéniques présentés par les molécules du CMH de type I (CMH-I) des CPA activées *via* leur TCR. Les LTC sont des cellules capables d'induire la mort des cellules infectées ou présentant un dommage (cellules tumorales par exemple). Suite à leur interaction avec une cellule présentant l'antigène sur son CMH-I, le LTC va sécréter des perforines qui induisent la formation de pores de la cellule cible. Ces pores permettent l'entrée des enzymes protéolytiques sécrétées par le LTC dans le compartiment intracellulaire de la cellule cible : notamment le granzyme B et la granulysine. Ces enzymes vont induire l'entrée en apoptose de la cellule⁶.

Suite à l'élimination de l'antigène, l'immunité adaptative met en place une mémoire immunitaire. En effet, lors de la réponse immunitaire primaire, certains lymphocytes mémoire développent la capacité de conférer une immunité à long terme contre cet agent pathogène. Lorsque

Etude bibliographique

Lorsqu'on rencontre un antigène pour la seconde fois, la réponse immunitaire adaptative dirigée contre cet antigène se met en place plus rapidement et plus efficacement (**Figure 4**). Dans le cas de la réponse humorale, cela traduit le fait que les lymphocytes B mémoire spécifiques de l'antigène prolifèrent et se différencient plus vite que les lymphocytes B naïfs, mais également qu'ils sont plus fréquents au sein de la population totale de lymphocytes B. Cette réponse n'est donc pas seulement plus rapide, mais également de meilleure qualité.

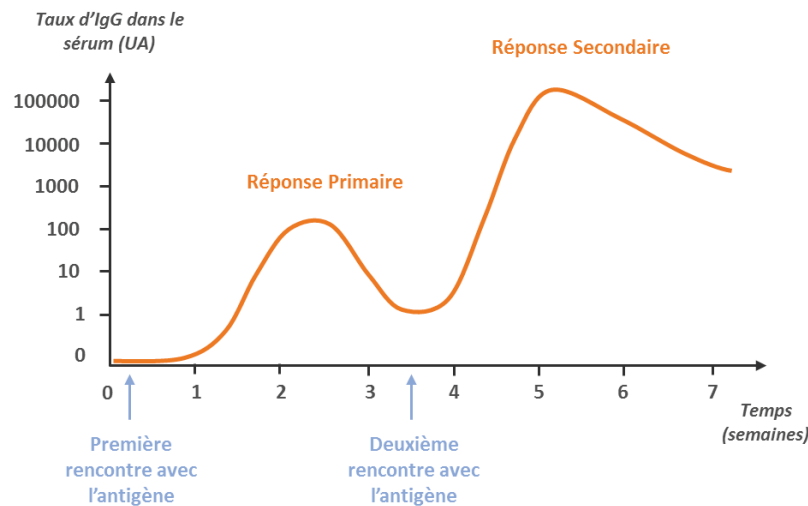


Figure 4 : Réponse primaire et secondaire face à un même antigène.

Lors de la première rencontre avec un antigène, l'induction de la réponse immunitaire humorale (avec la production d'IgG) est plus faible et moins rapide que lors de la seconde rencontre.

La mémoire immunitaire peut être induite dans le cas d'infection naturelle, mais également dans le cas de vaccination où un antigène sera injecté chez le patient. La vaccination a donc pour but de mimer une première rencontre avec l'antigène et permet la mise en place d'une réponse mémoire qui sera plus efficace pour contrôler l'infection elle-même.

Cependant, les mécanismes de réponse immunitaire protectrice varient en fonction du type de pathogène. Il est donc nécessaire d'induire une réponse immunitaire spécifique. Un vaccin idéal devrait mimer une forme non virulente, inoffensive, d'un pathogène donné, et être capable de provoquer une réponse immunitaire adaptée.

3. Des vaccins traditionnels aux vaccins acides nucléiques

Au cours des dernières décennies, les vaccins ont été un formidable outil dans la lutte contre les maladies infectieuses, et il existe actuellement de nombreux vaccins approuvés pour différentes pathologies. Un vaccin doit répondre à un cahier des charges précis : il doit être sûr et ne pas induire de pathologie, permettre une protection sur le long terme, être pratique d'un point de vue des coûts, de la stabilité et de la facilité d'administration, mais également présenter des effets secondaires limités.

Etude bibliographique

Les vaccins conventionnels peuvent être repartis en 4 grandes familles : les vaccins hétérologues et/ou atténués, les vaccins inactivés, les vaccins sous-unitaires et les protéines recombinantes. Ces familles de vaccins peuvent être classées selon leur degré de sophistication, leur immunogénicité et leur sûreté (**Figure 5**).

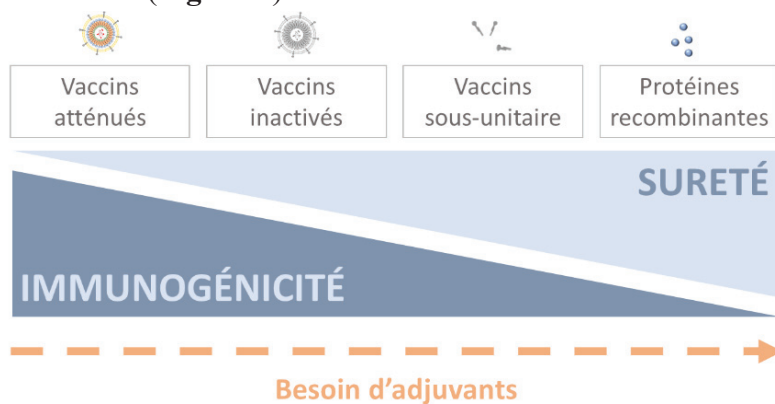


Figure 5 : Equilibre entre immunogénicité et sûreté des vaccins en fonction de leur niveau de sophistication. Avec la sophistication des vaccins, les antigènes utilisés ont été de plus en plus affinés, induisant une augmentation de la sûreté associée à une diminution de l'immunogénicité. Cette diminution de la capacité à activer le système immunitaire a été contrbalancée par l'ajout d'adjuvants.

Les vaccins traditionnels sont basés sur l'utilisation des pathogènes hétérologues venant d'espèces proches (comme le virus de la vaccine pour les vaccins de la variole⁷), ou des pathogènes atténués par divers procédés (comme dans le cas de la rage² ou plus récemment du rotavirus⁸) (**Figure 6**). Ce type de vaccins présente une forte immunogénicité intrinsèque et induit une protection des personnes à long terme, semblable à celle obtenue dans le cas d'une infection par le pathogène. Cependant, ces vaccins associés à un faible risque infectieux ou ne conduisant pas à une immunité adaptée, ne sont pas applicables pour certains pathogènes ainsi que chez certaines personnes à risques (personnes immunodéprimées, transplantées, etc.)⁹.

Par la suite des vaccins inactivés ont été produits à partir de virus, de bactéries ou de toxines inactivés ou tués, généralement sous l'effet de la chaleur ou de produits chimiques. Ce type de vaccin est retrouvé dans le cas des vaccins contre la peste ou encore l'hépatite A^{2,10}.

Une meilleure connaissance de l'organisation structurale des pathogènes, ainsi que des bases moléculaires de leur virulence et de leur caractère immunogène ont permis un progrès considérable dans la mise au point de nouveaux vaccins, et notamment des vaccins sous-unitaires ou utilisant des protéines recombinantes, au design plus raisonné.

Les vaccins sous-unitaires sont constitués de fractions antigéniques des pathogènes capables de déclencher une réponse immunitaire adaptée. Ils peuvent être composés de particules virales (VLP pour *Virus Like Particles*), d'anatoxines (des toxines de micro-organisme caractérisées par la perte de ses propriétés toxiques), ou d'antigènes capsulaires (polysaccharides) et membranaires (protéines bactériennes ou virales). On retrouve ce type d'antigènes dans les vaccins contre les méningocoque

Etude bibliographique

et pneumocoque². Les vaccins recombinants sont eux basés sur l'utilisation d'antigènes issus de la recombinaison génétique, comme dans le cas du vaccin contre l'hépatite B¹¹.

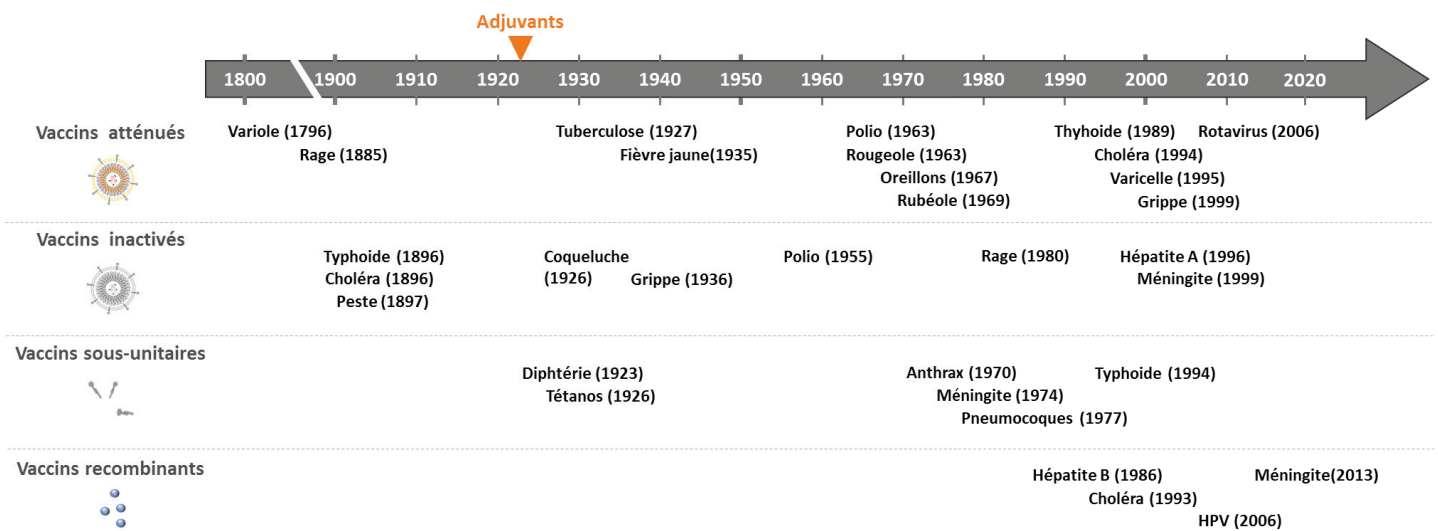


Figure 6 : Chronologie de développement des vaccins conventionnels.

Le développement de vaccins n'a cessé d'évoluer depuis les premiers tests réalisés en 1796 avec le vaccin contre la variole. 4 catégories de vaccins conventionnels ont été développées : les vaccins atténués et inactivés, puis les vaccins sous-unitaires et recombinants issus des meilleures connaissances des pathogènes et de l'évolution du génie génétique.

La faible immunogénicité de ces deux derniers types de vaccins nécessite l'utilisation d'outils supplémentaires : les adjuvants. Les adjuvants (du latin *adjuvare*, aider) ont pour but d'améliorer la reconnaissance des antigènes, et d'augmenter et/ou potentialiser leur immunogénicité intrinsèque pour induire les mécanismes d'immunité adaptés. Les adjuvants peuvent être divisés en deux classes : les systèmes de délivrance et les molécules immunostimulantes. Les systèmes de délivrance, tels que les nanoparticules de polymères, les liposomes ou les virosomes, améliorent l'exposition de l'antigène aux acteurs de l'immunité dans le but de stimuler la réponse immunitaire. A l'inverse des systèmes de délivrance, les molécules immunostimulantes, comme des ligands de TLR⁴, agissent directement en modulant le comportement du système immunitaire. Du fait du très grand nombre d'adjuvants, il est essentiel de déterminer la combinaison optimale qui permet d'activer au mieux les récepteurs de l'immunité innée et d'orienter les DC vers la maturation, sans pour autant risquer de déclencher des effets indésirables de type auto-immuns, ou bien d'amplifier les effets délétères de l'inflammation chronique qui est souvent associée aux tumeurs. Alors que les premiers adjuvants (aluminium, émulsions d'huile dans l'eau et l'adjuvant complet de Freund) étaient utilisés de façon empirique, l'amélioration continue des connaissances sur le rôle des adjuvants et la manière dont la réponse immunitaire peut être orientée ont permis la conception raisonnée de nouveaux adjuvants. Malgré ce développement, l'utilisation d'adjuvants dans les formulations vaccinales reste controversée.

Malgré le succès de ce type de vaccins conventionnels, il existe plusieurs obstacles majeurs au développement de vaccins appliqués à certains pathogènes infectieux, et notamment ceux qui ont la capacité d'échapper aux réponses immunitaires adaptatives¹². De plus, ces vaccins sont souvent associés à l'induction d'une réponse humorale, avec activation de la mémoire immunitaire. Ces vaccins, appelés vaccins prophylactiques, ont une efficacité limitée pour certaines pathologies, où une réponse cytotoxique permettrait l'élimination des cellules infectées ou endommagées, comme dans le cas du VIH ou des cellules tumorales¹³. Pour induire une réponse immunitaire cytotoxique, la vaccination s'est ainsi orientée vers l'utilisation de nouvelles stratégies permettant de mimer des antigènes intracellulaires, avec notamment l'utilisation d'acides nucléiques.

4. De nouvelles formulations vaccinales : les vaccins à acide nucléique

Les vaccins à acide nucléique, basés sur l'utilisation d'ADN ou d'ARNm, permettent la délivrance de séquences nucléotidiques qui codent pour des protéines antigéniques. Les vaccins à acides nucléiques ont émergé comme une alternative prometteuse aux approches de vaccinations conventionnelles. En effet, ce type de vaccins présente plusieurs avantages par rapport aux vaccins conventionnels. Tout d'abord, le développement de ce type de vaccins peut être très rapide car beaucoup d'antigènes ont déjà été identifiés, et de nombreux modèles animaux et techniques ont été optimisés pour tester les nouveaux vaccins. De plus, la production des acides nucléiques est standardisée, induisant un gain au niveau matériel et humain, mais également la réduction de la variabilité entre les lots. Enfin, les vaccins à acides nucléiques miment les infections virales naturelles. Suite à leur administration, la séquence nucléique va être traitée par la cellule comme lors d'une infection virale à ADN ou ARN. Ce type de vaccins peut permettre l'induction de réponse immunitaire humorale et/ou adaptative en fonction du mode d'administration et selon que l'acide nucléique code des protéines sécrétées et/ou intracellulaires. Cet avantage leur confère la capacité de traiter des pathologies difficiles à cibler avec les vaccins traditionnels.

L'utilisation d'acide nucléique dans les formulations vaccinales n'est pas récente. En effet, en 1990, Wolff et *al.* ont démontré que l'injection directe d'ADN plasmidique ou d'ARNm nu dans le muscle squelettique de souris permet l'expression de protéines¹⁴. A l'époque, le développement de vaccins utilisant les ARNm a été jugé peu réaliste en raison de l'instabilité, des problèmes de synthèse à grande échelle et de stockage de cette biomolécule, mais surtout des obstacles liés à leur délivrance. C'est pourquoi le développement ultérieur de vaccins à acides nucléiques a porté sur l'utilisation d'ADN et non d'ARNm.

Etude bibliographique

Les vaccins à ADN sont basés sur l'utilisation d'ADN plasmidique, contenant le gène viral d'un pathogène d'intérêt, sous contrôle d'un promoteur eucaryote puissant (type CMV). Une fois injecté dans l'organisme, le plus souvent en intramusculaire, intradermique ou sous-cutané, cet ADN va utiliser la machinerie de la cellule hôte pour produire des ARNm qui seront traduits en protéines antigéniques de manière permanente, s'accompagnant d'une réponse immunitaire prolongée dans le temps (Figure 7)¹⁵.

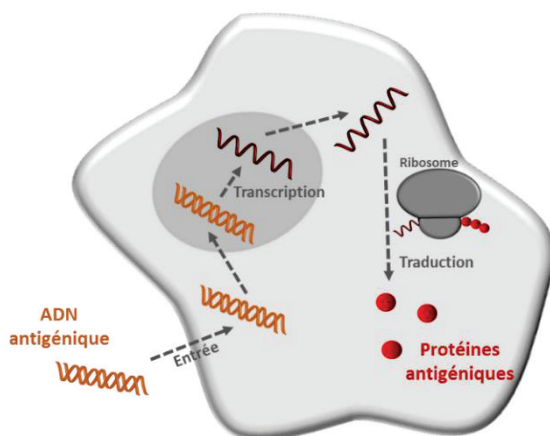


Figure 7 : Principe de la vaccination à ADN.

Un ADN antigénique va pénétrer une cellule immunitaire sur le site de l'injection. Cet ADN va alors être pris en charge dans le noyau de la cellule. Cet ADN va être transcrit en un ARNm qui sera traduit en la protéine antigénique correspondante.

Dans les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les protéines produites dans le compartiment cytosolique vont être reconnues comme pathogène intracellulaire. Des portions de ces protéines vont être présentées sur le CMH-I pour activer la réponse cytotoxique. De plus, les protéines produites qui seront relarguées dans le milieu extracellulaire (par exemple dans des stratégies utilisant un peptide signal qui dirige la protéine vers la voie sécrétoire) pourront être reconnues par des CPA pour induire une réponse humorale via l'interaction du CMH-II et des LT-CD4+. Depuis les premiers tests réalisés dans les années 90 chez les souris, de nombreuses études ont montré l'intérêt de l'ADN à visée vaccinale chez les animaux^{15,16}. Ces recherches ont abouti à la mise sur le marché européen d'un vaccin à ADN en 2016 (Clynav®) pour une application vétérinaire¹⁷. Ces résultats ont conduit aux premiers tests précliniques chez l'Homme dans le but de vérifier le profil de sûreté et la tolérance de ces vaccins. Ces études ont abouti à la réalisation de nombreux essais cliniques dans la cadre de vaccins contre la grippe, l'hépatite B, le VIH, mais également en cancérologie^{15,18,19}. Cependant, ces essais cliniques n'ont pas permis d'obtenir des résultats aussi prometteurs que chez les animaux, avec l'apparition de réaction locale et de réponses immunitaires faibles. Des modifications et améliorations de cette technologie sont en cours pour permettre leur utilisation chez l'Homme²⁰.

Face à ces résultats mitigés et à la levée de nombreux obstacles au développement de vaccins à ARNm, leur utilisation pour la conception de vaccins a suscité un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies.

5. Les ARNm : biomolécules de choix pour le développement de vaccins

Au cours des dernières années, les ARNm sont devenus les antigènes de choix pour délivrer l'information antigénique au système immunitaire. Le principe des vaccins à ARNm est d'injecter un ARNm antigénique (nu ou vectorisé) qui sera pris en charge par les cellules immunitaires. Dans le cytoplasme de la cellule, l'ARNm va être traduit en une protéine antigénique par l'intermédiaire de la machinerie de traduction de la cellule hôte. La traduction se répartit en 3 phases : l'initiation (liaison du ribosome au niveau de la coiffe et reconnaissance du codon d'initiation AUG), l'élongation (traduction du gène d'intérêt) et la terminaison (dissociation de la machinerie de traduction). La protéine formée va ensuite subir des modifications post-traductionnelles, résultant en protéines fonctionnelles. Cette protéine antigénique va être reconnue par le système immunitaire pour induire une réponse immunitaire adaptée (**Figure 8**).

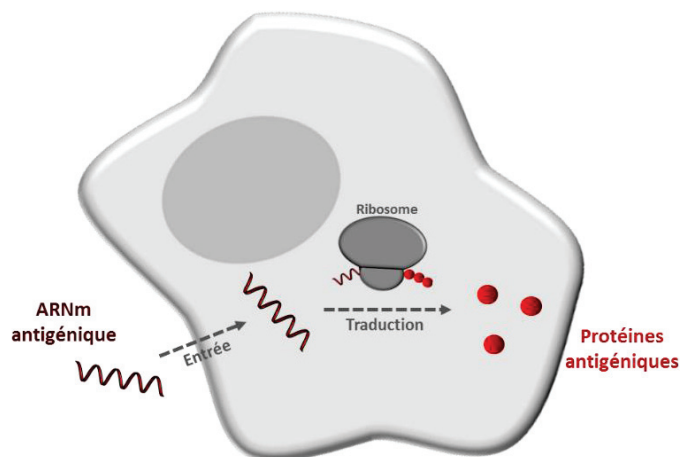


Figure 8 : Principe de la vaccination à ARNm.

Un ARNm antigénique va pénétrer une cellule immunitaire sur le site de l'injection. Cet ARNm va alors être traduit en la protéine antigénique correspondante par utilisation de la machinerie de traduction de la cellule hôte, et notamment par l'intermédiaire des ribosomes.

Des avantages clés existent pour l'utilisation d'ARNm dans un but vaccinal. Tout d'abord, l'utilisation d'ARNm présente des avantages en termes de sécurité. En effet, contrairement à l'ADN, l'ARNm est fonctionnel dans le cytosol : aucun risque d'intégration ou de mutation délétère dans le génome ne lui est associé^{21,22}. La « *Food and Drug Administration* » (FDA) et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) n'ont fourni aucune directive spécifique concernant leur utilisation pour la vaccination chez l'Homme. Cependant, le nombre croissant d'essais cliniques menés sous la supervision de l'EMA et la FDA indique que les régulateurs ont accepté les approches proposées. De plus, la demi-vie *in vivo* des ARNm sensibles aux dégradations peut être régulée par l'apport de certaines modifications ou de systèmes de délivrance. Leur expression transitoire chez le receveur permet ainsi de mieux contrôler la quantité d'antigènes et de minimiser les risques d'induction de

tolérance qui sont observés avec les expositions longues à l'antigène, notamment par les vaccins à ADN²³.

De plus, contrairement aux ADN vaccinaux qui doivent atteindre le noyau des cellules lors de la mitose, les ARNm agissent directement dans le cytoplasme. Ceci leur confère le potentiel d'agir sur les cellules en repos ou à faible capacité de division, telles que les cellules dendritiques. Ces cellules jusqu'alors peu ciblées ouvrent de nouvelles perspectives en vaccinologie.

Enfin, les outils actuels permettent la production d'ARNm *in vitro* de manière rapide et à grande échelle. La synthèse peut en effet être réalisée par transcription *in vitro* à partir de plasmides d'ADN complémentaires et d'ARN polymérase de bactériophages. Cette méthode plus simple et moins coûteuse que la production de protéines est un réel atout pour les industriels, notamment pour l'élaboration rapide de vaccins en cas de pandémie. En outre, puisque les acides nucléiques ne diffèrent entre eux que par leur séquence et gardent une même architecture, ils offrent une grande flexibilité pour le design de nouveaux vaccins. Ces dernières années, le domaine de la vaccination à ARNm a ainsi été développé très rapidement, et de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours.

1. Construction et production des ARNm antigéniques

a. Design des ARNm

Les ARNm antigéniques doivent mimer les ARNm eucaryotes afin d'avoir une stabilité suffisante, d'être traduits de manière efficace en protéines antigéniques, et d'induire une réponse immunitaire adaptée au type de pathogène. Pour cela, les ARNm doivent être composés de 5 régions importantes : une coiffe ou CAP, une région 5'UTR, une région portant la séquence codant l'antigène (ORF pour Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture), une région 3'UTR et une queue poly-A (**Figure 9**). La présence de l'ensemble de ces régions est importante pour permettre l'expression correcte de l'antigène et l'induction d'une réponse immunitaire adaptée²⁴.

La séquence d'ARNm débute par la présence de la coiffe : une structure constituée d'une guanosine méthylée en position N7 et liée à l'extrémité 5' des ARN par une liaison 5'-5' triphosphate. Cette coiffe est impliquée dans la protection contre les dégradations par les exo-ribonucléases dans le sens 5'-3' des ARNm²⁵. Cette structure aide également à l'initiation de la traduction grâce à son association avec le complexe d'initiation eIF4F (Facteur d'initiation eucaryote 4F), qui recrute les ribosomes²⁴ et à la régulation de la dégradation des ARNm²⁶.

Les régions 5' et 3' UTR sont des régions régulant la stabilité et l'efficacité de traduction de l'ARNm²⁷. En pratique, les régions 5' et 3' UTR de la β -globine de Xénope permettent de stabiliser efficacement les ARNm dans des modèles mammifères. Ces régions encadrent la séquence codant la

Etude bibliographique

protéine antigénique d'intérêt (ORF), qui débute avec le codon d'initiation AUG et s'achève avec un codon de terminaison de la traduction.



Figure 9 : Structure de l'ARNm antigénique.

Un ARNm vaccinal optimal comporte 5 séquences : une coiffe (CAP), une région 5'UTR englobant la séquence d'acide nucléique codant la protéine antigénique et une queue poly-A de taille suffisante. La séquence 5'UTR se termine par une séquence Kozak, qui comprend le codon d'initiation de la traduction. La séquence d'intérêt se termine par un codon de terminaison. Ces motifs permettent à l'ARNm d'acquiescer une bonne stabilité et de promouvoir une traduction correcte de l'ARNm. En vert sont indiquées les fonctions régulatrices des sites présents dans la séquence.

Pour terminer la séquence, une structure plus ou moins longue composée d'une succession d'adénosines est présente dans la région 3' : la queue poly-A. Cette queue poly-A joue un rôle crucial dans la régulation de la stabilité de l'ARNm, en permettant notamment de protéger les ARNm de l'activité des exo-ribonucléases dans le sens 3'-5'²⁴. La queue poly-A est également impliquée dans l'initiation et l'élongation de la traduction.

b. ARNm non-réplicatifs et auto-réplicatifs

Deux types majeurs d'ARNm sont utilisés dans les vaccins : les ARNm non-réplicatifs et les ARNm auto-réplicatifs, présentant chacun des avantages et des inconvénients (**Figure 10**).

Les ARNm non-réplicatifs codent uniquement pour l'antigène d'intérêt et leur séquence est composée uniquement des 5 éléments décrits précédemment. Ces ARNm ont donc une construction simple avec une taille réduite (1-3 kb), et permettent la traduction uniquement de la protéine antigénique d'intérêt évitant l'induction de réponse immunitaire non spécifique. Cependant, du fait de leur faible stabilité, ces ARN ne permettent qu'une expression transitoire de la protéine²⁸.

Au contraire, les ARNm auto-réplicatifs ont une taille considérablement plus large car ils contiennent, en plus des éléments présentés précédemment, une machinerie de réplication virale permettant l'amplification de la protéine exprimée. La machinerie de réplication la plus utilisée est dérivée du génome des alphavirus, tels que ceux des virus de l'encéphalite équine du Sindbis, de la forêt de Semliki et du Venezuela²⁹. La séquence d'ARNm va contenir une séquence codant 4 protéines non structurales (nsP1-4) et un promoteur subgénomique. Le gène viral est lui remplacé par le gène antigénique d'intérêt. Après la délivrance dans le cytoplasme des cellules, cet ARNm va

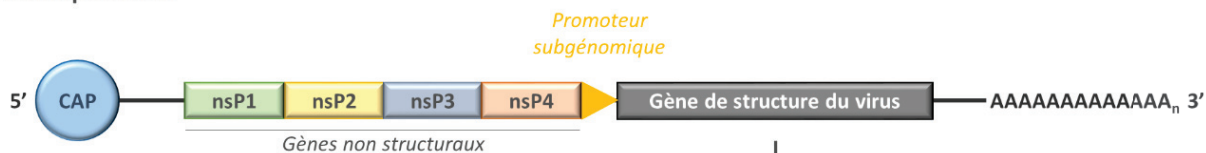
Etude bibliographique

produire les 4 protéines composant une ARN polymérase ARN-dépendante à partir des protéines nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4 ainsi que la protéine d'intérêt. L'ARNm auto-répliatif va donc avoir la capacité de produire une grande quantité de protéine antigénique dans la cellule hôte.

ARNm non répliatif



ARN de l'alphavirus



ARNm auto-répliatif

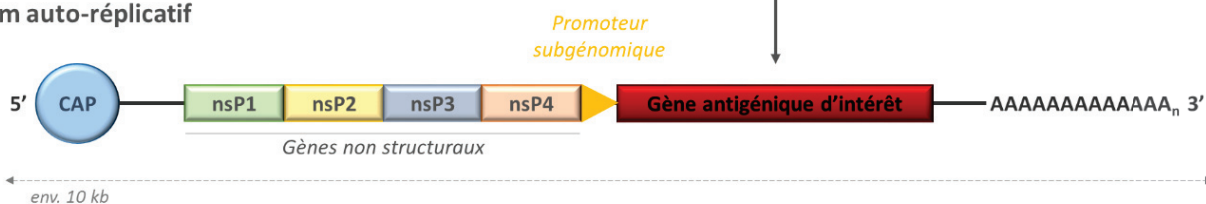


Figure 10 : Comparaison de structure des ARNm non répliatifs et auto-répliatifs.

Les ARNm non répliatifs sont composés d'une coiffe, de régions 5' et 3'UTR encadrant le cadre ouvert de lecture du gène antigénique d'intérêt (en rouge) et d'une queue poly-A. Les ARNm non répliatifs sont dérivés d'ARN d'alphavirus qui comprennent : 4 gènes codant des protéines non structurales (nsP1-4) qui codent pour le système de répliation du virus, un promoteur subgénomique dépendant de ce système de répliation, et un gène de structure. Ce gène de structure du virus est remplacé par le gène antigénique d'intérêt dans les ARNm auto-répliatifs.

Les ARNm auto-répliatifs ont montré des résultats intéressants pour divers antigènes dans différentes espèces, dont les souris, les primates non-humains et les Hommes³⁰. L'immunisation de souris avec 10 µg d'ARNm nu auto-répliatif codant pour l'hémagglutinine a protégé les animaux face à un challenge léta³¹. L'apparition de systèmes de délivrance a ensuite permis de diminuer les doses d'ARNm auto-répliatifs utilisés et d'en augmenter l'efficacité. 100 ng d'ARNm auto-répliatifs vectorisés dans des liponanoparticules (LNP) a en effet permis d'obtenir des réponses immunitaires chez des souris³². Chez l'Homme, une étude clinique de phase I réalisée dans le cadre du cytomégalo virus a montré que ce type de vaccin était bien toléré et permettait d'induire des anticorps neutralisants, mais également l'apparition de lymphocytes T spécifiques³³. Une comparaison des deux constructions a montré que les deux types d'ARNm permettaient l'induction d'une protection, mais à des doses très différentes. En effet, une quantité d'ARNm auto-répliatif 64 fois moins importante que d'ARNm conventionnel est nécessaire pour obtenir un même niveau de protection chez des souris vaccinées contre la grippe³⁴. Cet avantage confère la possibilité d'induire une réponse immunitaire suite à l'injection d'une simple dose d'antigène. Bien que ces ARNm

Etude bibliographique

présentent des inconvénients quant à leur utilisation en vaccination (leur taille rend la production et la purification plus difficile, le contrôle de l'expression est dépendant de la machinerie de réplication et les ARNm semblent plus immunogènes, etc.) plusieurs compagnies les utilisent pour le développement de vaccins à ARNm, et notamment Novartis.

c. Production des ARNm

Les ARNm antigéniques sont synthétisés par transcription *in vitro* (IVT) à partir d'un ADN plasmidique. La réaction de transcription *in vitro* est réalisée en présence d'une ARN polymérase de bactériophages de type T7, T3 ou Sp6, de ribonucléotides triphosphates (NTP), et de tampon contenant du DTT (dithiothréitol) et des ions magnésium²⁶. L'ADN plasmidique (ADNp) modèle contient au minimum un promoteur fort pour l'ARN polymérase, la séquence d'ARNm antigénique et un site de linéarisation se trouvant juste après la queue poly-A. Cet ADNp est amplifié en système bactérien (type *Escherichia coli*), isolé et purifié. Avant de réaliser la réaction d'IVT, la séquence d'ADNp est linéarisée en aval de la queue poly (A), pour éviter la génération d'ARNm circulaire. L'utilisation d'enzyme de restriction de type IIS, permettant la linéarisation en aval de la queue poly-A, a montré un avantage pour la traduction des protéines³⁵. Dans la réaction d'IVT, des enzymes et protéines associées à l'ajout de la coiffe et/ou de la queue poly-A peuvent être ajoutées afin de réaliser les modifications post-transcriptionnelles. Ces réactions peuvent également être réalisées *a posteriori*. Suite à la transcription, l'ADN plasmidique est dégradé et l'ARNm est purifié afin d'éliminer les nucléotides non incorporés, les enzymes nécessaires à la synthèse mais aussi les transcrits courts issus de synthèse abortive. Ces contaminants, reconnus par les récepteurs de l'immunité innée (PRR), induisent une production accrue d'interférons de type I qui régule l'expression et l'activation de la protéine kinase R (PKR) et de la 2'5'oliadhénylate synthétase. Ces protéines vont induire respectivement une inhibition de la traduction et une dégradation des ARN²³. Les contaminants issus de la synthèse peuvent être éliminés par différentes techniques de purification des ARNm, dont les plus couramment utilisées sont basées sur l'utilisation de chlorure de lithium ou par HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) et FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). En fonction de la technique utilisée, la qualité de l'ARNm est modifiée, ce qui influence la traduction. Une technique de purification basée sur l'utilisation d'une matrice de copolymère (polystyrène / divinylbenzène) et d'un tampon d'acétate de triéthylammonium avec un gradient d'acétonitrile a été mise au point. Cette technique de purification par HPLC permet l'élimination de certains contaminants qui activent les réponses immunitaires innées, et la traduction de la protéine 1000 fois plus efficacement dans des cellules primaires humaines³⁶. Une fois produits, les ARNm courants sont stockés à des températures de -70°C ou -20°C, bien que plusieurs groupes aient développés des formulations stockées dans diverses conditions²³.

Par rapport aux vaccins traditionnels, cette production présente différents avantages. (1) La production n'est en effet pas spécifique à un antigène cible, réduisant le temps de production. (2) Les ARNm sont des biomolécules avec une structure moléculaire bien définie. Le système qualité lié à la recherche et au développement devrait ainsi être plus facilement mis en place. (3) Le délai nécessaire à la mise en place de nouveaux lots devrait être très court, éliminant le passage dans des cellules hôtes. Les séquences d'antigènes peuvent en effet être développées et mises à disposition rapidement par des techniques de bio-informatique. (4) Les ARNm sont des biomolécules non infectieuses, sans risques pour l'environnement. La production peut alors être réalisée dans les salles blanches classiques, sans confinement particulier. La production peut être réalisée selon des normes de bonne pratique de fabrication (BPF ou GMP). (5) Les vaccins à ARNm peuvent être lyophilisés et stockés à température ambiante, simplifiant la logistique et la distribution dans les zones subtropicales et tropicales^{37,38}. Cet avantage permettrait d'obtenir une meilleure couverture vaccinale.

2. Capacité immunostimulante des ARNm

Pour être efficace, les vaccins doivent contenir des adjuvants, qui sont reconnus comme signaux de dangers par les cellules immunitaires. Les ARNm antigéniques sont eux-mêmes reconnus par le système immunitaire inné comme des pathogènes *via* des récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (*Pattern Recognition Receptor*)^{39,40}. La reconnaissance des ARN est médiée dans les endosomes et lysosomes par des récepteurs transmembranaires nommés TLR (*Toll-Like Receptors*), et dans le cytosol par l'intermédiaire de différents PRR : les récepteurs RIG-I (*Retinoid-acid-Inductible Gene I*) et MDA-5 (*Melanoma Differentiation Antigen 5*) majoritairement (**Figure 11**).

Ces récepteurs sont exprimés dans divers tissus et cellules. Ils vont induire des cascades d'activation de voies intracellulaires aboutissant à la production de médiateurs de l'inflammation (cytokine pro-inflammatoire et chimiokines notamment). Ces médiateurs vont permettre par la suite d'influer sur l'activation de la réponse immunitaire pour induire une réponse adaptative spécifique au pathogène.

L'activation des récepteurs TLR dans le cas de vaccins est essentielle pour amorcer les réponses immunitaires. Ces récepteurs sont présents dans les endosomes et lysosomes des cellules de l'immunité, et notamment des cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B³⁹. Ces cellules impliquées dans la phagocytose des antigènes vont ainsi promouvoir la rencontre des ARNm antigéniques avec ces récepteurs. Les ARN simple brin et double brin présents dans les endosomes sont reconnus par les récepteurs TLR7 / 8 et TLR3 respectivement. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires dirigées contre les infections virales naturelles, mais il a été montré qu'ils étaient activés non seulement par les ARN double brin viraux, mais également par les

Etude bibliographique

ARNm libérés par les cellules et produits par transcription *in vitro*⁴¹. Les ARNm antigéniques notamment *via* des structures secondaires vont pouvoir activer les TLR spécifiques des ARN simple brin et double brin.

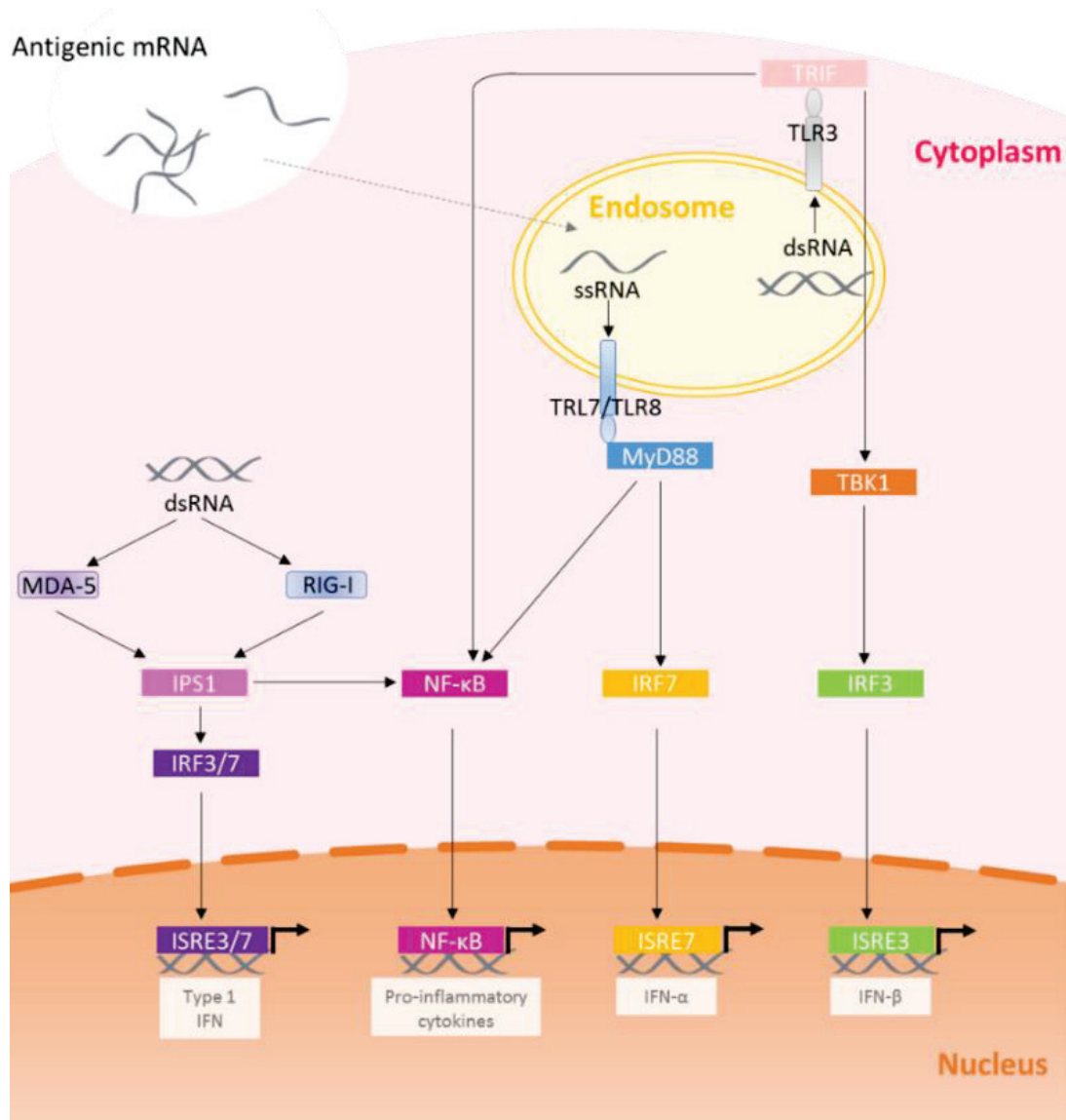


Figure 11 : Activation des PRR par les ARNm antigéniques (Adapté de Gutjahr A. *et al.*, 2016⁴).

Le système immunitaire inné a évolué de manière à reconnaître les agents pathogènes, y compris les ARN du non soi. Dans les endosomes, les ARN simple brin (ssRNA) sont reconnus par le TLR7/8, alors que les ARN double brin (dsRNA) le sont par le TLR3. La signalisation induite par le TLR7 est médiée par la protéine adaptatrice MyD88, résultant en l'activation des facteurs de transcription IRF7 et NF-κB. L'activation du TLR3 induit l'activation de la protéine TRIF qui permet l'induction des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB. Dans le cytoplasme, des PRR sont également présents pour reconnaître les ARNm et induire des signaux de dangers : les récepteurs MDA-5 et RIG-I. Ces derniers permettent l'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et du NF-κB.

Les récepteurs TLR7 et 8 interagissent avec les ARN simple brin essentiellement, mais peuvent aussi reconnaître de courtes séquences d'ARN double brin. Ces récepteurs induisent l'activation de la voie du MyD88. Cette voie d'activation résulte en l'activation de facteurs de transcription (AP1), de NF-κB et du facteur de régulation de l'interféron IRF7. Ces facteurs contribuent à l'expression des cytokines pro-inflammatoires et à l'activation des cellules immunitaires⁴².

Etude bibliographique

Le récepteur TLR3 est présent essentiellement sur les cellules immunitaires, à l'exception des neutrophiles et des DC plasmacytoïdes (pDC)⁴⁰. Ce récepteur interagit pour sa part avec des ARN double brin viraux ou synthétiques (tels que les poly I :C), sans spécificité de région. La présence de 40 paires de bases minimum est nécessaire pour permettre son activation et l'affinité est proportionnelle avec la taille des ARNm³⁹. Ceci suggère qu'un ARNm simple brin comportant une structure secondaire suffisamment longue pourrait activer ce récepteur. Le récepteur TLR3 active la signalisation *via* la protéine TRIF (protéine adaptatrice comportant un domaine TIR), entraînant l'activation du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) et de la protéine TBK1, régulant elle-même le facteur de régulation de l'interféron IRF3. Cette voie de signalisation permet la production d'interférons de type I (IFN), essentiel pour l'induction d'une réponse antivirale et de cytokines pro-inflammatoires⁴².

Les récepteurs PRR cytosoliques jouent également un rôle important dans l'effet adjuvant des ARNm. Les récepteur RIG-I (ou DDX58), MDA5 (ou IFIH1) reconnaissent les ARN double brin essentiellement⁴. Le récepteur RIG-I reconnaît plus particulièrement les ARNm ne présentant pas de cap dans la région 5'⁴³. A l'inverse, le récepteur MDA-5 interagit avec les ARN double brin longs et une région particulière de la coiffe^{40,44}. Ces récepteurs induisent la voie d'activation de la protéine ISP1 (ou MAVS) qui entraîne l'induction des facteurs de transcription IRF3 et 7, mais également du NF- κ B. Cette voie conduit donc à l'expression d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires⁴². De plus, nous pouvons noter qu'il existe d'autres récepteurs cytosoliques moins décrits qui sont impliqués dans la reconnaissance des ARNm : les récepteurs NLRP3, NOD2, LGP2, PKR et l'enzyme 2'5' oligoadénylate synthase^{40,45}.

Quel que soit le récepteur impliqué, les ARNm vaccinaux conduisent à une production de cytokines pro-inflammatoires et une forte sécrétion d'interférons de type I (IFN- α et β), impliqués dans la protection aux infections virales. En fonction de l'application thérapeutique, cette fonction des ARNm peut avoir des avantages et des inconvénients. De nos jours, la communauté scientifique discute encore sur les bénéfices d'une telle activation dans le cadre de vaccins à ARNm⁴⁶. En effet, une dualité existe sur le rôle de l'IFN-I qui induit certes une forte activation de la réponse immunitaire innée et la maturation des cellules dendritiques, mais diminue également le taux de production de protéines antigéniques capables d'activer la réponse adaptative cytotoxique (LT-CD8+). Il est proposé que l'effet de l'IFN-I dépende du moment et de l'intensité de production de l'IFN-I par rapport à l'activation des LT-CD8+⁴⁷. Si l'activation de la cellule T (*via* la liaison CMH-I/peptide au TCR des lymphocytes naïfs) précède ou coïncide avec la signalisation de l'IFN-I, cette cytokine va favoriser la différenciation et l'expansion des cellules T CD8+ en cellules cytotoxiques (LTC). En revanche, si la signalisation de l'IFN-I précède l'activation des cellules T CD8+, l'IFN-I va avoir une action inhibitrice sur l'induction d'une réponse cytotoxique⁴⁷. Afin de diminuer cette forte

Etude bibliographique

immunogénicité intrinsèque des ARNm et de moduler l'induction des réponses immunitaires, des modifications peuvent être apportées dans les séquences (voir paragraphe suivant).

Bien que les ARNm présentent une immunogénicité intrinsèque, elle peut être augmentée par l'ajout d'adjuvants dans certains cas. Les adjuvants utilisés incluent les adjuvants classiques et ceux développés pour les vaccins à ARNm prenant en compte les avantages liés à l'immunogénicité intrinsèque des ARNm ou leur capacité à être traduits en protéines immunostimulantes²³. Un ARNm auto-répliquatif formulé dans une nanoémulsion de MF59 (Novartis) a montré une bonne immunogénicité accompagnée d'une efficacité de traduction dans plusieurs modèles animaux⁴⁸. Une autre approche efficace est l'utilisation de TriMix, une combinaison d'ARNm codant pour une protéine CD70, un ligand de CD40 et un TLR4 activé. L'ajout de TriMix aux ARNm antigéniques a permis d'augmenter leur immunogénicité et d'induire une forte réponse cytotoxique dans plusieurs études de vaccins contre le cancer^{49,50}, mais aussi dans le cas du VIH-1⁵¹. De plus, les technologies RNActive et RNAdjuvant, développées par CureVac^{52,53}, ont montré des résultats prometteurs en recherche, et actuellement quatre essais cliniques de phase I sont en cours dans le cadre de vaccins contre des cancers ou contre la rage^{52,54}.

3. Optimisation des ARNm vaccinaux

Ces dernières années, beaucoup d'études se sont intéressées à l'amélioration des ARNm vaccinaux pour augmenter leur stabilité extra et intracellulaire et leur capacité de traduction, et influencer sur leur immunogénicité^{26,55}. Les ARNm sont des biomolécules extrêmement versatiles : des modifications peuvent être apportées sur l'ensemble des régions présentes dans la séquence de l'ARNm antigénique.

Modifications au niveau de la coiffe

Une structure particulière appelée coiffe, correspondant à une guanosine méthylée en position N7 (m7G) et liée à la partie 5' des ARNm par une liaison 5'-5' triphosphate, peut être ajoutée aux ARNm au cours de la synthèse *in vitro* de ces derniers. La présence de cette guanosine méthylée est essentielle à la traduction de l'ARNm en protéine, en aidant à la reconnaissance par la machinerie de traduction. Il existe deux approches majeures pour permettre l'ajout de cette coiffe aux ARNm transcrits *in vitro*, présentant chacune des avantages et des inconvénients.

La première technique est basée sur l'utilisation d'enzymes recombinantes dérivées du virus de la vaccine⁵⁶. Ce complexe porte trois activités enzymatiques (une activité ARN tri-phosphatase, guanylyl-transférase et guanine méthyl-transférase) nécessaires à l'ajout d'une coiffe cap 0 (m7GpppN) ou d'une cap 1 (m7GpppN 2'O-méthyl-NpNp). La cap 1 produite est identique à la coiffe qui est le plus souvent trouvée dans les ARNm eucaryotes²⁶. Cependant l'utilisation de ce complexe

Etude bibliographique

nécessite l'ajout d'une étape enzymatique supplémentaire qui peut compliquer la production à grande échelle.

La deuxième technique est basée sur l'utilisation d'analogues de coiffe. Les premières études ont utilisé les coiffes analogues de type m7GpppG. Cependant, il a été montré que cette dernière était souvent incorporée dans le sens inverse lors de synthèse *in vitro*, induisant la mauvaise position de la m7G et une reconnaissance altérée par la machinerie de traduction²⁶. Avec cette coiffe analogue conventionnelle, seulement un tiers des ARNm seraient correctement coiffés⁵⁷. Une coiffe anti-reverse analogue ou ARCA a alors été développée pour permettre la mise en place de la coiffe uniquement dans le bon sens. Il a été montré que la présence de cette coiffe permet de doubler la capacité d'expression des protéines *in vitro*, en lysat de réticulocyte de lapin⁵⁸. Cette coiffe a montré un intérêt particulier pour l'augmentation de la demi-vie des ARNm⁵⁹, mais également pour l'induction d'une meilleure production de protéines en culture⁶⁰. Depuis la première utilisation de cette coiffe, des modifications lui ont été apportées au niveau du pont triphosphate dans le but d'éviter le décrochage de la coiffe et ainsi de favoriser la liaison des facteurs de traduction. Cette coiffe ARCA modifiée a montré de bons résultats au niveau de l'allongement de la demi-vie et de l'efficacité de traduction *in vitro*⁶¹.

De plus, des études récentes ont montré l'existence de structure en 5' similaire à la coiffe des ARN eucaryotes dans plusieurs espèces bactériennes. Ces structures, et notamment la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺ et NADH) et la coenzyme A dephosphorylée (dpCoA), peuvent réguler la stabilité des ARNm⁶².

Modifications au niveau des régions 5' et 3' UTR

Les régions non traduites (UTR pour untranslated region) sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, notamment en régulant l'efficacité de traduction, la localisation subcellulaire et la stabilité des ARNm^{63,64}. L'optimisation des parties 5' et 3' UTR est donc très importante dans le design du vecteur antigénique.

Dès le début de production d'ARNm par transcription *in vitro*, les séquences comportaient des régions 5' et 3' UTR et notamment celles du gène de la β -globine du Xénope. La présence des régions 5' et 3' de la β -globine du Xénope a montré un réel avantage au niveau de l'efficacité de traduction dans des lignées cellulaires^{35,65}. De nombreuses études ont cherché à comparer l'influence de ces régions sur l'efficacité de traduction des protéines. Par exemple, le groupe de Holtkamp *et al.* a montré que la liaison de deux régions 3' UTR de la β -globine du Xénope permettait d'obtenir un niveau de protéine plus important et une persistance d'expression meilleure qu'en présence d'une seule séquence 3'UTR³⁵. La combinaison de la région 5'UTR de la β -globine et de la région 3'UTR de l' α -globine du Xénope est également connue pour stabiliser les ARNm⁶⁶. Ces régions UTR sont

Etude bibliographique

très largement utilisées dans les séquences d'ARNm ayant une visée thérapeutique^{67,68}. Des études ont également été menées en utilisant des séquences UTR issues de divers organismes. Par exemple, il a été montré que la région 5'UTR du virus de la gravure du tabac (ou tobacco etch virus) augmentait l'efficacité de traduction dans différents types de cellules et dans le modèle la souris^{69,70}. De plus, la région 5'UTR de la protéine humaine Hsp70, comportant des éléments importants à la régulation post-transcriptionnelle, a permis d'augmenter la traduction *in vitro* en cellules de mammifère⁷¹.

En fonction du besoin thérapeutique, la production de protéines peut être nécessaire sur une durée courte. Pour cela, des séquences riches en A et U peuvent être ajoutées dans les régions 3'UTR, pour permettre une dégradation rapide de l'ARNm et ainsi une expression sur un temps limité⁷².

Modifications au niveau de la séquence du gène

Plusieurs modifications peuvent être apportées directement dans les séquences codantes (ORF) pour modifier leur reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée, de favoriser la stabilité et l'expression des ARNm, et ainsi d'induire une réponse immunitaire soutenue et adaptée. Nous décrirons dans cette partie uniquement certaines modifications majeures ayant un impact sur la vaccination à ARNm.

Au cours de l'initiation de traduction, les facteurs d'initiation eIF se lient à la partie 5' et la protéine de liaison à la queue poly-A (PABP) au niveau de la partie 3' et plus particulièrement au niveau de la queue poly-A. La liaison de ces protéines permet la reconnaissance du codon d'initiation AUG. Dans le but d'éviter les initiations défectueuses, la présence de la séquence Kozac (A/G CCAUGG) englobant le codon d'initiation a montré un réel avantage. Cette séquence ainsi que la séquence entourant le codon de terminaison peuvent être optimisées pour permettre une meilleure efficacité de traduction^{73,74}.

Des observations menées sur les ARNm naturels ont également montré une corrélation entre la quantité de nucléotides modifiés dans les ARNm et le potentiel d'activation des réponses immunitaires. L'apport de nucléotides modifiés naturels dans les séquences d'ARNm, telles que la pseudouridine (ψ), la 5-méthyluridine (m5U), la 2-thiouridine (s2U), la 5-méthylcytidine (m5C) et la N6-méthyladénosine (m6A) ont notamment montré un intérêt. L'ajout de nucléotides modifiés dans les séquences des gènes permet de réduire la reconnaissance par les récepteurs de l'immunité innée et d'augmenter l'efficacité de transfection, tout en gardant une induction résiduelle des interférons de type I et des cytokines pro-inflammatoires^{36,75,76}. Le groupe de Kariko *et al.* a notamment montré que la modification des uridines (m5U, s2U ou pseudouridines) conduit à l'incapacité des ARNm à activer les DC primaires. De plus, ils ont montré que les modifications m6A ou s2U suppriment la capacité de reconnaissance des ARNm par TLR3 alors que les modifications m5C, m5U, s2U, ψ ou m6A induisent une altération de la reconnaissance par les récepteurs TLR7 et 8^{46,75}. De plus, il a été montré

Etude bibliographique

que l'apport de m⁵C et/ou de ψ dans les séquences d'ARNm augmente de 9 fois l'expression de protéines en culture⁷⁷, et apporte une meilleure stabilité *in vivo* en souris^{70,78}. Des études plus récentes ont montré que la modification m¹ ψ (1-méthylpseudouridine) augmente de 13 fois l'expression de la protéine *in vivo* par rapport à un ARNm portant des ψ ou des m⁵ ψ ²⁴. Cependant, nous pouvons noter qu'à l'inverse des études menées par le groupe de Kariko *et al.*, deux groupes ont montré que la présence de ces nucléotides modifiés n'améliorait pas l'efficacité de traduction^{79,80}.

Ces dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées à l'ajout d'un peptide signal, court peptide de 5 à 30 nucléotides, à l'extrémité N-terminale des protéines pour permettre d'adapter la distribution des ARNm dans la cellule⁸¹⁻⁸³. Cette modification se fait par ajout de la séquence du peptide signal en amont de la séquence de l'antigène. Ce signal permet aux protéines traduites de se diriger plus spécifiquement dans un compartiment cellulaire donné. Dans le cas d'ARNm codant pour des protéines antigéniques, la présence de ce peptide signal peut permettre d'orienter la protéine vers les voies de dégradation par le protéasome ou les lysosomes, ce qui conduit à l'induction de réponses immunitaires cytotoxiques et humorales, respectivement.

Modifications au niveau de la queue poly-A

La queue poly-A représente la structure terminale des ARNm antigéniques. Cette queue poly-A a également montré un avantage particulier dans la stabilisation des ARNm, mais aussi sur leur traduction en protéine en agissant de manière synergique avec la coiffe⁶³. Cette structure peut être ajoutée aux ARNm soit par une réaction enzymatique de polyadénylation après synthèse *in vitro*, soit par clonage d'une queue poly-A directement dans la séquence de l'ADN plasmidique modèle. Cependant, il est important de noter que la taille de la queue poly-A obtenue par synthèse enzymatique est dépendante des conditions de réaction, et notamment du temps de réaction et de la quantité de polymérase³⁵. Pour contrôler le nombre de nucléotides et permettre une bonne reproductibilité, la méthode d'ajout du nombre souhaité de nucléotides dans la séquence de l'ADN plasmidique est donc plus adaptée.

Comme vu précédemment, cette structure est essentielle à la protection des ARNm vis-à-vis des phénomènes de dégradation, et influe donc sur la demi-vie de ces derniers. La taille de cette structure a été très étudiée ces dernières années afin d'identifier le nombre de nucléotides optimal pour obtenir la meilleure expression^{35,84}. Dans un premier temps, les ARNm utilisés dans les études précliniques comportaient des queues poly-A avec une taille de 30 à 70 nucléotides, et des essais cliniques ont été réalisés avec une taille de 64 nucléotides³⁵. Cependant plusieurs études ont montré l'avantage de l'allongement de la queue poly-A sur l'efficacité de traduction. Les transcrits ayant une queue poly-A plus courte sont plus rapidement dégradés et induisent une quantité de protéine plus faible et de manière moins prolongée dans le temps³⁵. Grâce aux résultats de plusieurs études, il a été

Etude bibliographique

conclu que la taille optimale de la queue poly-A pour les ARNm transcrits *in vitro* est comprise entre 120 et 150 nucléotides^{35,63,85}.

Dernièrement, le groupe de Uchida S. *et al.* a construit un ARNm comportant une séquence double brin uniquement au niveau de la queue poly-A, en réalisant une hybridation avec une séquence poly-U. Cette construction favorise la reconnaissance des ARNm par les récepteurs TLR3 et RIG-I, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, cet ARNm est traduit efficacement en protéine et induit des réponses immunitaires humorale et cytotoxique *in vivo* chez la souris significativement plus fortes qu'avec un ARNm classique⁸⁶.

Combinaison des modifications

La combinaison des modifications amplifie les avantages de ces changements. Dès les premiers tests, la présence d'une coiffe et des régions UTR de la β -globine ont montré une efficacité de traduction des ARNm 1000 fois plus importante qu'avec un ARNm sans ses éléments⁶⁵. De plus, de nombreuses études ont montré l'effet synergique de la présence d'une coiffe et d'une queue poly-A pour induire une meilleure efficacité de transfection^{84,85,87}. La présence de ces deux structures semble en effet favoriser la formation d'un complexe entre la coiffe et la queue poly-A, *via* les facteurs eIF4 et PABP, permettant la formation d'une boucle qui aide au recyclage des ribosomes⁸⁷ et permet la protection des ARNm⁸⁸. Depuis, de nombreuses études utilisant des combinaisons de modifications au niveau de plusieurs régions ont été publiées^{35,85}.

Les études semblent s'entendre sur certaines modifications essentielles, comme la présence d'une coiffe, des régions 5' et 3'UTR, ou d'une queue poly-A de taille comprise entre 120 et 150A, mais la présence de certaines modifications, comme l'ajout de nucléotides modifiés, fait encore débat. Un résumé des modifications les plus couramment citées et donnant les résultats les plus prometteurs est présenté dans le **Tableau I**.

Bien qu'aucun design idéal n'ait été décrit, il est important de noter que les modifications doivent être adaptées au pathogène ciblé afin d'induire la réponse immunitaire la plus proche de celle obtenue dans le cas d'une infection naturelle. L'ensemble de ces modifications peut en effet induire des changements au niveau de la structure secondaire des ARNm, sur la traduction et les modifications post-traductionnelles apportées aux protéines antigéniques, et ainsi sur les portions antigéniques présentées et l'induction des réponses immunitaires²³.

Tableau I : Modifications recommandées pour un vecteur optimal.

Régions	Modifications optimales	Fonctions	Ref
Coiffe	ARCA / ARCA modifiée	Augmente la stabilité et l'efficacité de traduction	59–61
5' et 3' UTR	Séquence de β -globine	Augmente la stabilité et l'efficacité de traduction	35,65–68
ORF	Séquence Kozak	Favorise l'expression	73
	Nucléotides modifiés (ψ , m5C etc...)	Diminue la reconnaissance par les PRR et l'induction de IFN-I Augmente la stabilité et l'efficacité de traduction	46,70,75–78
	Addition d'un peptide signal	Orientation de la réponse	81–83
Queue poly-A	Taille entre 120 et 150 pb	Augmente la stabilité et l'efficacité de traduction	35,63,85
	ARN db sur la queue poly-A	Augmente l'immunogénicité, la stabilité et l'efficacité de traduction	86
Séquence complète	Purification HPLC	Diminue l'immunogénicité non spécifique et augmente l'efficacité de traduction	36

4. Complexité de délivrance des ARNm

Plusieurs ARNm vaccinaux ont été développés ces dernières années et validés par des études d'immunogénicité et d'efficacité de traduction. Pour donner ces réponses, l'ARNm exogène doit traverser une bicouche lipidique pour être internalisé dans le cytoplasme des cellules cibles et traduit en un antigène fonctionnel. Les ARNm nus sont spontanément pris en charge par plusieurs types cellulaires différents. Bien que la première démonstration de l'expression d'ARNm injecté en intramusculaire *in vivo* ait été réalisée avec de l'ARNm nu¹⁴, ce mode de délivrance présente un inconvénient majeur. En effet, les ARNm nus présents dans le milieu extracellulaire sont rapidement dégradés par les RNAses et ne sont pas internalisés efficacement dans les cellules hôtes. Une des difficultés majeures liée à l'utilisation des ARNm dans le développement de vaccins reste la méthode de délivrance.

De plus, comme nous avons pu le voir, la recherche se tourne actuellement vers le développement de vaccins thérapeutiques capables d'induire une réponse cytotoxique permettant l'élimination des cellules infectées ou altérées. Pour induire une réponse immunitaire cytotoxique, les ARNm doivent pénétrer dans les cellules de l'immunité, et notamment les cellules dendritiques, être traduit en protéines antigénique pour être reconnus comme pathogènes intracellulaires et être présentés sur le CMH-I. Le ciblage et la transfection des cellules dendritiques représente donc un obstacle clé dans la réalisation de tels vaccins à ARNm. Ces dernières années, plusieurs approches ont été testées pour améliorer la délivrance et notamment l'optimisation des stratégies d'injection, la biolistique (administration par *gene gun*), la condensation des ARNm par la protamine et l'utilisation de vecteurs⁸⁹. Le développement de système de délivrance aux cellules dendritiques sera discuté dans la partie suivante.

II. LE CIBLAGE DES DC PAR LES VACCINS A ARNm

1. Les cellules dendritiques : cibles de choix en vaccination

1. Origine et sous-populations

Les cellules dendritiques (DC) ont été initialement identifiées par Paul Langerhans au niveau de la peau en 1868. Pendant plus d'un siècle, les scientifiques ne se sont pas intéressés à ces cellules dont on ignorait complètement la fonction. Ce n'est qu'en 1973 que les cellules dendritiques sont décrites par Steinman and Cohn comme étant les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles de l'organisme⁹⁰. Cette découverte a été récompensée par le prix Nobel de Médecine en 2011.

Les DC représentent une population extrêmement hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules interviennent à différents niveaux dans le système immunitaire et leurs fonctions diverses sont accomplies par différentes sous-populations qui se distinguent sur des bases morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles, mais aussi par leur origine hématopoïétique. Pendant longtemps, il a été admis que les DC dérivent d'un progéniteur myéloïde commun, à l'exception des DC plasmacytoïdes (pDC) qui dérivent, elles, d'un progéniteur lymphoïde⁹¹. Cependant des travaux récents montrent que l'ontogénie des DC est plus complexe et que les sous-populations de DC, en particulier les pDC, peuvent partager plusieurs origines à la fois myéloïdes et lymphoïdes⁹². La plasticité des DC à se différencier à partir de deux types de précurseurs est, à ce jour, une caractéristique exclusive des DC. Cette caractéristique leur permet d'adapter le nombre et la nature des DC au sein d'un tissu en fonction de l'état d'inflammation de ce dernier, ce qui fait des DC une population importante dans la mise en place et la régulation de la réponse immune. Les sous-populations de DC, initialement établies en fonction de leurs origines, sont maintenant principalement caractérisées par leur phénotype, leur fonction et leur localisation (**Figure 12**)⁹². Chaque sous-population exprime des PRR différents et répond à des stimuli différents suggérant une fonction distincte dans les réponses immunitaires⁹³.

Les DC plasmacytoïdes (pDC) sont une sous-population rare de cellules ; elles représentent seulement 0,1 % des cellules sanguines. Suite à la détection d'un stimuli, cette cellule de forme arrondie à l'état immature, développe une morphologie de DC⁹³. Elles sont spécialisées dans la production d'IFN de type I en réponse aux infections virales. Elles ont des capacités de capture et de présentation antigénique plus restreintes que les DC conventionnelles.

Etude bibliographique

Les DC conventionnelles (cDC) sont composées de deux groupes caractérisés par des phénotypes différents. En fonction de leur localisation et de leur état d'activation, chacun de ces deux groupes peut être assimilé à des DC résidentes ou des DC migratoires. Les DC résidentes sont principalement situées dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles vont rester de manière durable. Les DC migratoires sont présentes dans les tissus périphériques et dans la circulation sanguine. Après leur activation, elles vont migrer jusqu'au ganglion lymphatique le plus proche⁹⁴. Du fait de la grande quantité de ces cellules au niveau sanguin, de nombreuses équipes ont exploité les cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC). Ces cellules sont issues de monocytes (progéniteurs des cDC) purifiés dans le sang et différenciés en DC par utilisation d'une combinaison de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) et d'IL-4 (Interleukine-4). Cependant, il est important de noter que ces cellules sont différentes des cDC naturelles au niveau des réponses, des phénotypes et de l'expression des PRR⁹³.






	pDC	cDC		CD8+ DC	C. de Langerhans	DC du derme
						
Marqueurs	CD11c- CD1a- CD123+ BDCA2+ BDCA4+	CD11c+ CD1a- CD14- BDCA1+	CD11c+ CD1a- CD14+ BDCA1+	CD11c+ CD1a- BDCA3+	CD11c+ CD1a+ CD14- BDCA1+ Langherine +	CD11c+ CD1a+ CD14- BDCA1+ Langherine -
Localisation	Sang Tissus lymphoïde	Sang Tissus lymphoïde	Tissus Ganglions lymphatiques périphériques	Sang Tissus lymphoïde	Tissus (<i>Epiderme</i>)	Tissus (<i>Derme</i>)
PRR des ARNm	TLR7	TLR3 TLR7 TLR8	TLR3 TLR7 TLR8	TLR3 ^{faible}	TLR3 TLR7	TLR3 TLR7 TLR8
Fonctions	Réponse antivirale Lien entre immunité innée et adaptative Production IFN-I	Activation des LT CD4+ Cross-présentation	Activation des LT CD4+ Cross-présentation	Activation des LT CD8+ Cross-présentation	Activation des LT CD8+ et LT CD4+ (Th2)	Activation des LT CD8+ et/ou LT CD4+

Figure 12 : Sous-populations et phénotypes de DC chez l'Homme (Adapté de Merad M *et al.*, 2013⁹²).

Les DC peuvent être classées en différents sous-types définis selon leur phénotype, leur origine et leur localisation dans l'organisme. Chaque sous-population présente des récepteurs PRR différents conduisant à des réponses immunitaires variées.

Les DC inflammatoires (CD8+ DC) sont absentes des tissus en dehors du contexte inflammatoire. En réponse aux cytokines pro-inflammatoires produites lors de la mise en place de la réponse innée, les monocytes du sang se différencient en CD8+ DC, qui migrent alors jusqu'au ganglion drainant. Ces DC ont des capacités importantes de présentation antigénique et d'activation des lymphocytes T⁹⁵.

Des DC sont naturellement présentes au niveau de la peau : les cellules de Langerhans dans l'épiderme et les DC du derme. Ces DC ont également la capacité de migrer jusqu'au ganglion drainant en cas d'inflammation⁹⁶. Il est important de noter que la classification des cellules de Langerhans parmi les DC reste controversée⁹⁶⁻⁹⁸. Bien qu'elles présentent des fonctions semblables à celles des DC, ces cellules peuvent être classées comme macrophages résidents de la peau⁹⁷.

Des DC particulières peuvent également être décrites : les DC folliculaires (FDC). Les FDC constituent un groupe de cellules résidant dans les follicules B des organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules sont indispensables à la régulation de la réponse humorale mais n'ont pas la capacité de présenter des antigènes comme les DC conventionnelles⁹⁹. Suite à la détection d'un antigène, les FDC vont faire le lien entre les réponses innées, *via* l'activation des TLR, et adaptative (et notamment les cellules B) en amplifiant cette dernière. De plus, les FDC sont impliquées dans l'élimination des cellules B apoptotiques, un rôle crucial dans la prévention de l'auto-immunité⁹⁹.

2. Fonctions des cellules dendritiques

Les DC sont des cellules rares (1-3 % des cellules de la peau et des muqueuses et moins de 1 % des leucocyte circulants) qui jouent un rôle majeur dans le système immunitaire. Les cellules dendritiques sont caractérisées par leur capacité à capturer les antigènes par des mécanismes d'endocytose, à les apprêter et les présenter sous forme de peptides associés au CMH de classe I ou de classe II. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Les DC présentent une localisation optimale pour la prise en charge des antigènes et l'induction de réponses immunitaires. On les retrouve dans les tissus stratégiques de défense du système immunitaire comme la peau ou les muqueuses (site d'injection des vaccins), ainsi que dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatique, rate, etc.) où sont concentrés les lymphocytes T (LT) naïfs¹⁰⁰. Elles jouent un rôle central dans l'induction des réponses immunes et assurent le lien entre système immunitaire inné et adaptatif (voir **Figure 1**, Partie I.2).

Les DC se trouvent dans deux états différents : immature et mature (**Figure 13**)¹⁰¹. A l'état immature, les DC sont disséminées dans l'ensemble de l'organisme et ont une fonction de sentinelle et de capture de l'antigène. En effet, elles vont scanner les tissus et muqueuses à la recherche de potentiels antigènes. Elles ont la capacité de distinguer les agents solubles pathogènes et non pathogènes (protéines alimentaires par exemple). En cas de présence d'un signal de danger, elles vont être recrutées sur la zone inflammatoire suivant un gradient de cytokines et chimiokines chimio-attractantes qui sont produites par les cellules de la réponse innée ou les cellules de l'épithélium. Parmi les molécules impliquées dans le recrutement des DC, on retrouve notamment le GM-CSF et le MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein-3 α) ou CCL20. Sur le site inflammatoire,

Etude bibliographique

la DC immature va capturer l'antigène et l'apprêter, c'est-à-dire le fragmenter en peptides antigéniques et l'associer à une molécule de CMH. En parallèle, la DC immature va détecter une multitude de stimuli comme signaux de danger et va entrer dans un processus de maturation.

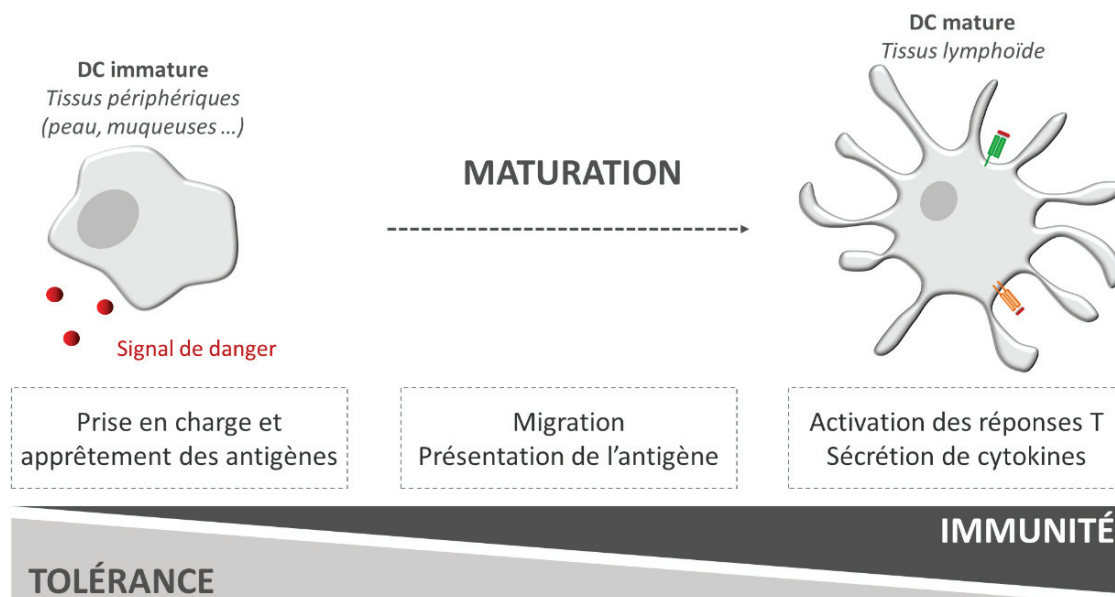


Figure 13 : Etats de maturation fonctionnels des cellules dendritiques.

La DC immature est située dans les tissus périphériques (peau et muqueuses), principale voie d'entrée des antigènes vaccinaux. Sur le site d'injection, la DC va capturer l'antigène et l'apprêter. Une fois l'antigène capturé, la DC va entrer dans un processus de maturation, lui permettant de présenter l'antigène sur les molécules de CMH-I ou II et de migrer vers le ganglion lymphatique le plus proche. Dans cet organe, lieu de résidence des LT naïfs, la DC mature va activer les cellules T et induire une réponse immunitaire adaptée à l'antigène. L'ensemble de ces étapes correspond au processus d'immunité. La DC est également impliquée dans les mécanismes de tolérance : une maturation altérée de la DC n'induirait pas de réponse immunitaire.

Au cours de cette étape de maturation, la cellule dendritique va présenter le peptide antigénique couplé à une molécule de CMH à sa surface. Elle va également exprimer différents récepteurs impliqués dans la migration vers les organes lymphoïdes secondaires et dans l'activation des réponses immunitaires. En effet, la DC a une forte capacité de migration¹⁰¹. Le récepteur de chimiokines CCR7 va être exprimé à la surface des DC, pour permettre la migration de la DC vers le ganglion lymphatique drainant le site d'injection, selon un gradient de chimiokines (CCL19 et CCL21)^{102,103}. Une fois dans le ganglion drainant, la DC se trouve dans un état mature.

Les DC matures sont ainsi caractérisées par la surexpression des molécules du CMH I et/ou II, présentant l'antigène, de molécules de co-stimulation et d'adhésion comme le CD40, CD80, CD83, CD86 et du récepteur CCR7. Grâce à la présence de ces récepteurs de surface et à sa localisation particulière dans les ganglions lymphatiques et plus particulièrement au niveau des centres germinatifs, la DC va interagir avec les LT naïfs et induire leur activation. L'activation des lymphocytes par les cellules dendritiques se fait par le déclenchement de trois signaux : (1) la liaison entre le complexe CMH-peptide et le récepteur TCR des cellules lymphocytaires T, (2) l'interaction entre les co-récepteurs de surface permettant la prolifération et la survie des lymphocytes T, et (3) la

production de cytokines qui permettent d'orienter la différenciation des lymphocytes T (**Figure 14**). Ces 3 signaux permettent d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse adaptative humorale (LT CD4+) ou cytotoxique (LT CD8+). De plus, les DC ont la capacité de présenter des antigènes intacts directement aux cellules B pour permettre la production d'anticorps dirigés contre le pathogène¹⁰⁴. En outre, les DC matures, *via* leur sécrétion d'IL12 et d'IFN de type I, sont aussi capables d'activer les cellules NK (*Natural Killer*)¹⁰⁵, qui jouent un rôle majeur dans la réponse cytotoxique. De même, elles peuvent activer les cellules NKT (*Natural Killer T*) grâce à l'expression de la molécule CD1c permettant la présentation d'antigènes glycolipidiques.

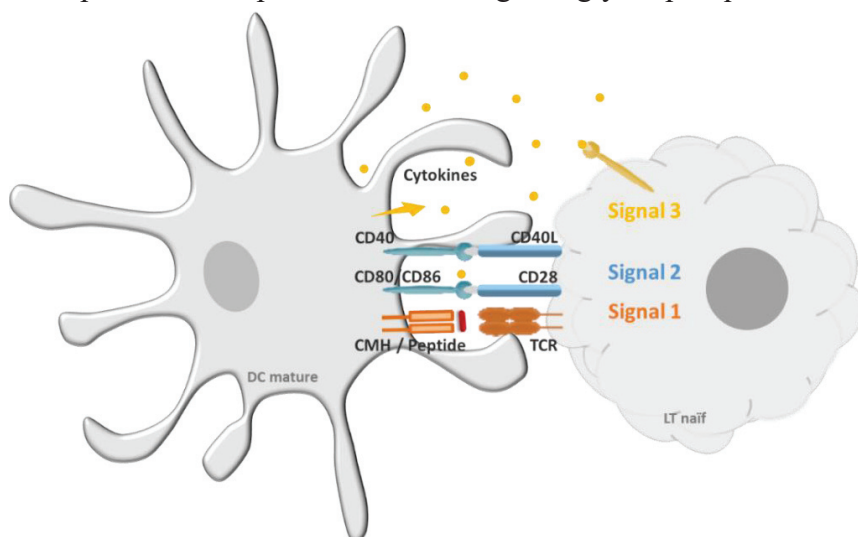


Figure 14 : Signaux d'activation des lymphocytes T naïfs par les DC.

La cellule dendritique mature fournit les 3 signaux nécessaires à l'activation et la différenciation des LT naïfs en LT CD4+ ou LT CD8+. Le signal 1 est dû à l'interaction entre les complexes CMH/peptide et le récepteur TCR du LT naïf. Le signal 2 correspond à l'interaction entre les récepteurs de co-stimulation (CD80/CD86 et CD28 ; CD40 et CD40 ligand (CD40L)). Les interactions entre des récepteurs permet la formation d'une synapse qui favorise la rencontre avec les cytokines sécrétées par la DC mature : il s'agit du signal 3 d'activation. Selon la nature de l'antigène présenté et du type de CMH, du niveau d'activation de la DC et des cytokines présentes dans l'environnement, le LT naïf va se différencier afin d'adapter la réponse à l'antigène.

Les DC sont aussi impliquées dans des phénomènes de tolérance importants pour empêcher le développement de maladies auto-immunes. En effet, une présentation de l'antigène non fonctionnelle ne déclenche pas de réponse et induit une tolérance immunitaire envers ces antigènes.

Toutes ces caractéristiques confèrent aux cellules dendritiques un rôle central dans l'immuno-surveillance, puisque, comme illustré précédemment, les mécanismes cytotoxiques, qu'ils soient cellulaires ou médiés par les anticorps, et les mécanismes de tolérance sont contrôlés directement ou indirectement par la cellule dendritique.

a. Voies d'endocytoses des antigènes par les DC

Les cellules dendritiques sentinelles présentes au niveau des tissus et des sites d'injection des vaccins se trouvent dans un état immature. Ces DC immatures sont capables de capturer une grande variété de molécules et de micro-organismes présents dans l'environnement selon des processus actifs

Etude bibliographique

regroupés sous le terme endocytose. L'internalisation de l'antigène est un processus propre aux cellules dendritiques immatures qui diminue au cours de leur maturation. Les propriétés d'endocytose sont en effet perdues lorsque les cellules dendritiques deviennent matures avec notamment une diminution de l'expression des récepteurs spécifiques de l'endocytose et de la phagocytose.

Différents mécanismes peuvent être utilisés par les cellules dendritiques pour capturer les antigènes. Ces mécanismes sont divisés en 2 catégories principales : la phagocytose et la pinocytose (Figure 15)^{106,107}.

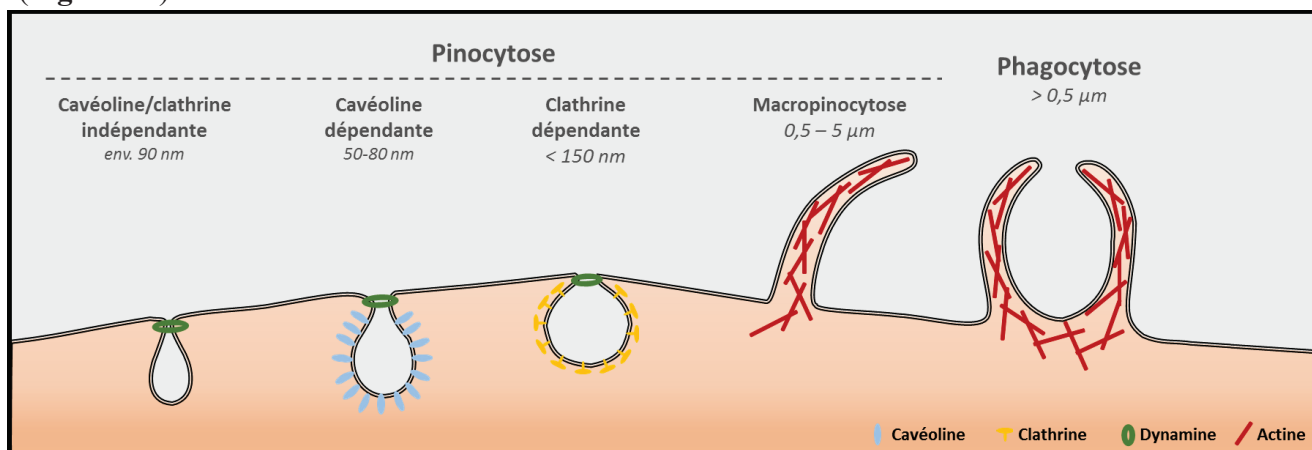


Figure 15 : Voie d'endocytose des antigènes par les cellules dendritiques.

Les DC immatures sont des cellules phagocytaires douées de plusieurs processus d'endocytose divisés en deux groupes principaux : la pinocytose et la phagocytose. Parmi les processus de pinocytose, la pinocytose clathrine dépendante ou par cavéoles-dépendante, et la macropinocytose sont retrouvés. Selon la nature et la taille de l'antigène, le mécanisme impliqué sera différent.

La phagocytose est un processus d'internalisation actif qui est présent dans certains types de cellules spécialisées, les cellules phagocytaires comme les macrophages, les monocytes, les neutrophiles mais surtout les cellules dendritiques. Ce mécanisme fait intervenir des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique et des cascades de signalisation médiées par les rho-GTPases. Cette voie est couramment utilisée pour l'endocytose des gros antigènes comme les bactéries, les levures et les gros débris cellulaires ($> 0,5 \mu\text{m}$). Cette voie est aussi impliquée dans le phénomène de cross-présentation des antigènes^{108,109}.

La pinocytose peut être sous divisée en plusieurs mécanismes : l'endocytose médiée par les clathrine, l'endocytose médiée par les cavéolines, l'endocytose clathrine et cavéoline-indépendantes et la macropinocytose. La voie d'endocytose clathrine-dépendante est la voie la mieux caractérisée. Cette voie nécessite la présence d'un manteau de clathrine autour de l'invagination membranaire et de la dynamine, une GTPase, pour permettre la formation de la vésicule d'endocytose à l'intérieur de la cellule. Après reconnaissance des molécules à la surface cellulaire, une invagination de la membrane va avoir lieu conduisant à la formation d'une vésicule d'une taille inférieure à 150 nm recouverte de clathrine. La vésicule va être libérée de la membrane plasmique grâce à la dynamine, puis va fusionner avec les endosomes et lysosomes. La deuxième voie de pinocytose avec formation

Etude bibliographique

de vésicules est la voie cavéole-dépendante. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane qui contiennent un réseau de cavéoline-1 et forment des vésicules de 50 à 80 nm¹¹⁰. Les cavéoles sont présentes en particulier dans des îlots lipidiques (rafts lipidiques) riches en cholestérol et sphingolipides. La formation et le déplacement des vésicules sont dépendants du réseau d'actine. Contrairement à la voie clathrine-dépendante, les cavéoles peuvent fusionner avec les endosomes précoces, mais surtout avec les cavéosomes où aucune acidification n'a lieu¹¹⁰. Des mécanismes de pinocytoses clathrine et calvéoline-indépendant existent également. Ils ne nécessitent pas toujours la présence de dynamine pour libérer les vésicules. La macropinocytose permet l'internalisation de fluides dans des vésicules de grande taille (0,5 à 5 µm) grâce à la formation d'extensions au niveau de la membrane qui sont soutenues par des filaments d'actine et régulées par les rho-GTP-ases. Ce mécanisme est également dépendant des pompes Na⁺/H⁺, qui permettent de rectifier le pH acide cytosolique des cellules suite à l'internalisation d'une molécule.

La plupart des voies d'endocytose entraînent la formation de vésicules qui fusionnent avec les endosomes précoces. Ces endosomes peuvent maturer en endosomes tardifs qui vont fusionner avec les lysosomes. Un gradient de pH s'établit à l'intérieur de ces vésicules allant du moins acide dans les endosomes (pH 6,5 – 6,8) au plus acide dans les lysosomes (pH 4,5). Dans les lysosomes, l'environnement acide ainsi que la présence de nombreuses hydrolases vont conduire à la dégradation de la molécule internalisée. Dans le cas de vaccins à ARNm, il est facilement envisageable qu'une dégradation des ARNm ait lieu avant même leur traduction en protéine selon le compartiment endosomal où ils se trouvent : le vaccin peut donc être non fonctionnel. Dans le développement de vaccins, cela implique que les ARNm doivent s'échapper des endosomes suite à leur internalisation pour être traduits en protéine antigénique fonctionnelle. En général, la voie d'entrée est régulée par la structure des agents internalisés (taille, charge et stabilité), mais aussi par la nature de la cellule ciblée¹¹¹. Comme nous le verrons plus loin, les ARNm chargés négativement sont souvent vectorisés à l'aide de complexes chargés positivement. Ces dernières années divers polymères et lipides cationiques ont été utilisés pour vectoriser les ARNm et favoriser l'échappement des endosomes en influençant sur la pression osmotique à l'intérieur des endosomes ou en déstabilisant la membrane de ces compartiments : c'est l'effet éponge à proton¹¹².

Actuellement, il n'y a aucun consensus quant à la voie la plus optimale pour la délivrance des ARN vaccinaux. Selon le type de vecteur, les ARNm seraient internalisés surtout par voie d'endocytose clathrine-dépendante ou par cavéoles après interactions électrostatiques avec les protéoglycanes et glycosaminoglycanes, macromolécules anioniques présentes sur la face externe de la membrane plasmique^{111,113}. L'internalisation par voie clathrine dépendante a montré une transfection plus efficace que les voies indépendantes de la clathrine¹¹¹. D'autres groupes ont montré

l'intérêt de la voie de pinocytose par cavéoline pour une transfection optimale des acides nucléiques car elle n'implique pas la fusion avec des vésicules acides, ce qui prévient la dégradation^{114,115}.

b. Induction des réponses immunitaires par les ARNm vaccinaux dans les DC

Suite à l'injection des ARNm, ces derniers vont être capturés par la cellule dendritique, comme décrit précédemment. Selon la voie d'entrée, il est possible que ces derniers se retrouvent dans les endosomes et qu'une étape supplémentaire d'échappement soit nécessaire. Dans le cytoplasme des DC, les ARNm vont ensuite être traduits en une protéine antigénique intracellulaire. Cette protéine antigénique va alors pouvoir activer une réponse immunitaire spécifique de l'antigène (Figure 16).

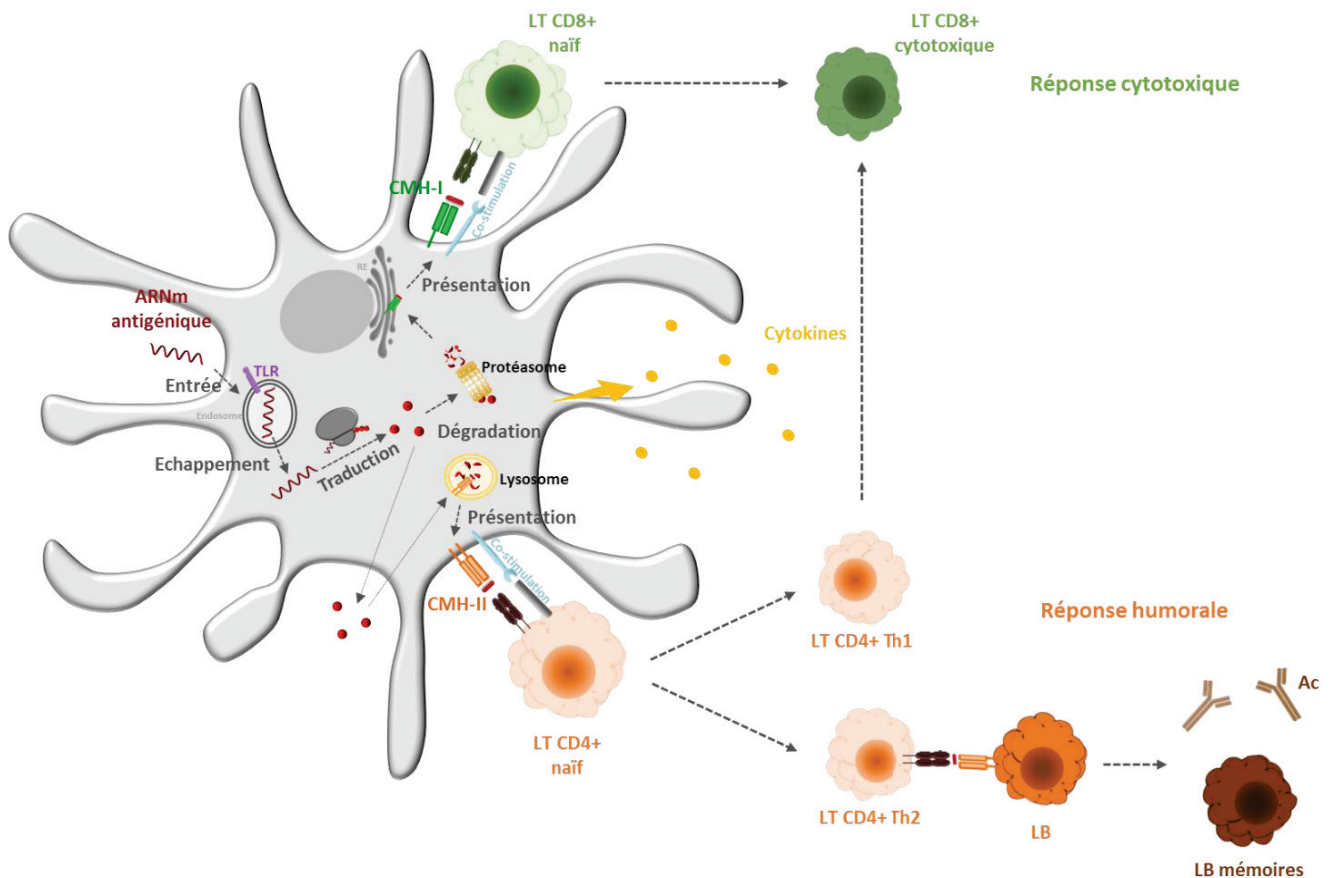


Figure 16 : Induction de la réponse immunitaire adaptative par les vaccins à ARNm dans les DC.

Suite à l'immunisation par des vaccins à ARNm, ces derniers vont pénétrer dans les cellules dendritiques (DC) par des voies d'endocytoses. Les ARNm contiennent des motifs capables d'activer les PRR exprimés par les DC, conduisant à l'activation de la réponse innée et la maturation de la DC. Dans le cytoplasme des DC, les ARNm vont être traduits en protéines antigéniques par la machinerie de traduction de la cellule hôte. Ces antigènes endogènes vont être dégradés par le protéasome et être apprêtés sur le CMH-I au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Le complexe CMH-I/peptide va induire l'activation des LT-DC8+ naïfs et une réponse cytotoxique. Il est également possible que les protéines synthétisées soit excrétées dans le milieu extracellulaire et soient ensuite reconnues comme antigènes exogènes par une nouvelle DC. La protéine sera dans ce cas dégradée par les lysosomes, et les peptides seront chargés sur le CMH-II. Le complexe CMH-II/peptide conduira à l'activation des LT-CD4+ et à l'activation de la réponse humorale.

La protéine antigénique produite au sein de la cellule va être reconnue comme pathogène intracellulaire par la cellule. Cette dernière va alors être dégradée en portions de peptides antigéniques

Etude bibliographique

par le protéasome, organite de dégradation des protéines synthétisées dans le cytoplasme. Au niveau du réticulum endoplasmique, ces peptides sont couplés au CMH de type I, puis transportés à la surface cellulaire par la voie de sécrétion. Le complexe CMH-I/peptide présenté à la surface de la CPA contribue alors à activer les lymphocytes T cytotoxiques (LT-CD8) : il s'agit de la réponse cytotoxique.

Il est également possible que les protéines antigéniques soient excrétées hors de la cellule. Dans ce cas, une nouvelle DC peut prendre en charge l'antigène et le traiter comme un antigène exogène. La protéine sera alors internalisée par la cellule dendritique dans des vésicules qui vont fusionner avec les endosomes, puis les lysosomes. La protéine sera alors dégradée en peptides antigéniques par les hydrolases des lysosomes. Ces peptides issus de protéines exogènes sont alors chargés sur le CMH de type II et le complexe CMH-II/peptide va migrer à la membrane pour activer les lymphocytes T helper (LT-CD4). Selon l'environnement cytokinique, ces derniers vont se différencier en T_{H1} ou T_{H2} . Les LT CD4⁺ de type T_{H1} vont aider la réponse cytotoxique en stimulant les LT CD8⁺. Les LT CD4⁺ de type T_{H2} vont eux permettre d'activer à leur tour les lymphocytes B qui vont se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps mais aussi de lymphocytes mémoires présents à long terme dans l'organisme. Dans ce cas, l'ARNm antigénique activera la réponse humorale. Alternativement, les peptides exogènes dégradés dans les endosomes peuvent aussi être présentés sur le CMH de classe I, permettant l'activation des lymphocytes T CD8⁺, grâce à la voie de la cross-présentation^{116,117}.

Les ARNm vaccinaux peuvent ainsi permettre d'induire non seulement une réponse humorale (anticorps) comme dans les vaccins classiques, mais surtout une réponse cellulaire (LT CD8⁺) qui peut être essentielle dans la lutte contre des infections chroniques comme dans le cas du VIH et constitue un avantage important des vaccins à ARNm^{13,118}.

2. Stratégies de délivrance des ARNm aux cellules dendritiques

Les thérapies basées sur l'utilisation de cellules dendritiques (DC) ont été testées dans le cas de traitements contre le cancer¹⁰⁰, mais aussi pour le contrôle d'infection chronique, comme dans le cas du VIH¹¹⁹. En effet, les DC sont capables d'induire des réponses immunitaires à la fois cytotoxiques mais aussi humorales suite à l'injection d'antigènes.

Cependant, dans le cadre du développement de vaccins à ARNm, la délivrance des ARNm vaccinaux aux cellules dendritiques *in vivo* est une étape critique pour l'induction de réponses immunitaires efficaces. Les ARNm exogènes doivent en effet pénétrer la barrière lipidique pour atteindre le cytoplasme et être traduits en une protéine antigénique. La distribution au niveau des

Etude bibliographique

organes et des cellules ainsi que les mécanismes de prise en charge des ARNm semblent être dépendants du type cellulaire, des propriétés physico-chimiques des ARNm et du mode de délivrance de ces derniers. Bien que certaines études se soient intéressées à la délivrance des ARNm nus, plusieurs approches ont été utilisées pour permettre leur délivrance, comme l'utilisation de méthodes physiques ou de vecteurs viraux et non viraux¹²⁰. La délivrance des acides nucléiques par des vecteurs viraux a notamment été étudiée par utilisation de virus tels que les adénovirus, les lentivirus ou le virus de Sendai^{121,122}. Cependant, l'expression de l'ARNm délivré *via* ces vecteurs est difficile à contrôler et la production de ce type de vaccin est coûteuse. De plus, l'utilisation de ce type de vaccin reste limitée par l'apparition de réponses immunitaires non spécifiques à l'antigène¹²³. La recherche s'est ainsi orientée vers l'utilisation de techniques physiques et de divers systèmes de délivrance non viraux pour le transfert des ARNm (**Figure 17**).

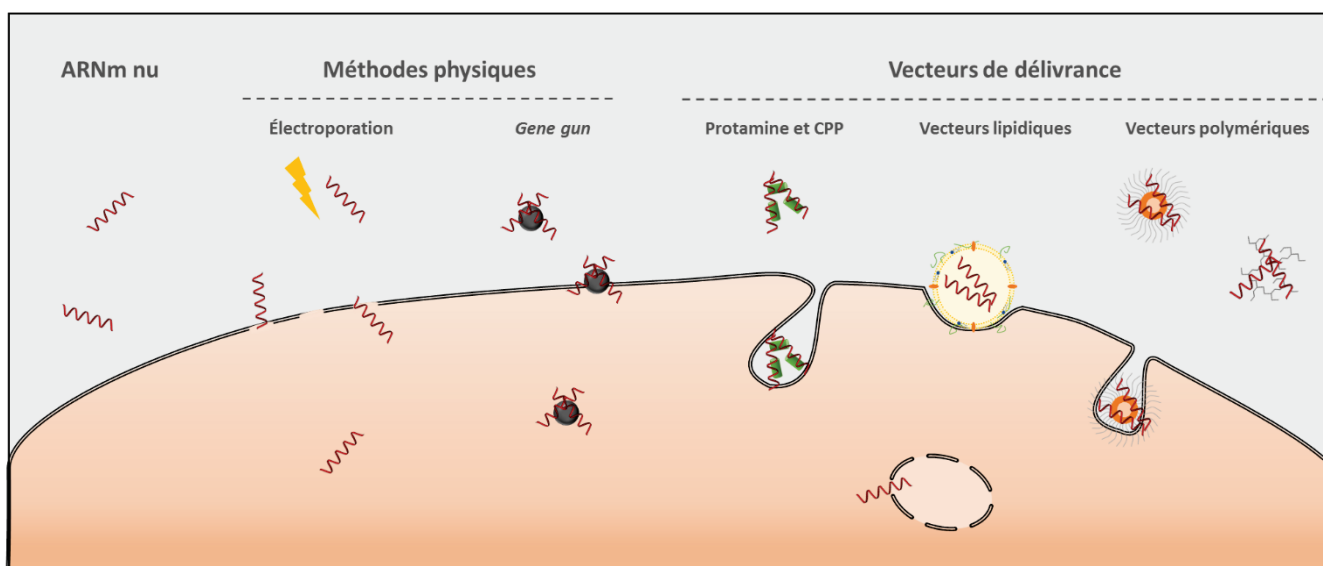


Figure 17 : Approches majeures de délivrance des ARNm pour le ciblage des cellules dendritiques.

Plusieurs méthodes sont utilisées dans la délivrance des ARNm vaccinaux. Certaines études se sont intéressées à la délivrance des ARNm nus, bien que cette approche soit limitée par la répulsion due aux charges inverses de la membrane et des ARNm. Des méthodes physiques telles que l'électroporation et le bombardement de gènes (*gene gun*) ont également été développées pour permettre l'entrée directe dans les cellules dendritiques *in vitro* ou *in vivo*. Enfin, diverses stratégies utilisant des vecteurs sont employées pour favoriser la délivrance des ARNm *in vivo*. L'utilisation de la protamine ou de peptides cationiques pénétrants (CPP), les vecteurs lipidiques (lipoplexes, LNP etc..) et polymériques (PEI, nanomicelles et dendrimères) ont notamment montré un intérêt particulier pour l'induction de réponses immunitaires.

1. Les méthodes de délivrance des ARNm

a. Délivrance des ARN messagers nus

Les ARNm sont des macromolécules poly-anioniques. Leur passage seul à travers la membrane plasmique des cellules présentant elles-mêmes de nombreuses charges négatives représente donc une étape délicate dans le développement de vaccins. L'ARNm nu, sans moyen de délivrance, est pris en charge par les cellules avec un taux très faible de 1 pour 10000 molécules. De

Etude bibliographique

plus, la demi-vie de ces ARN en intracellulaire est très faible (7 heures) du fait de leur susceptibilité à la dégradation²⁴. Cependant, les ARNm nus ont été utilisés avec succès dans certaines études d'immunisation. La délivrance des ARNm sous ce format a montré des résultats prometteurs essentiellement suite à des administrations en intradermique^{124,125} et en intranodal^{50,68,126}. En effet, l'injection d'ARNm nus en intradermique a conduit à l'expression efficace des ARNm suite à leur internalisation par les DC résidentes du derme *via* macropinocytose. Les protéines synthétisées ont conduit à l'induction d'une réponse T chez dans un modèle souris¹²⁴. De manière intéressante, il a été montré dans une étude clinique récente que l'injection répétée d'ARNm nu non modifié codant pour un antigène tumoral au niveau du ganglion lymphatique inguinal permet d'induire une réponse T robuste et une diminution de la progression tumorale¹²⁶.

Le groupe de Pascolo a été pionnier dans l'administration d'ARNm nu contre le mélanome en réalisant le premier essai clinique de phase I/II¹²⁷. Cependant, aucun effet clinique n'a été observé. Selon les auteurs, l'efficacité des vaccins à ARNm pourrait être améliorée par utilisation de système de vectorisation des ARNm permettant de diminuer les doses injectées tout en augmentant la réponse immunitaire induite¹²⁸.

b. Méthodes physiques de délivrance des ARNm

Afin d'améliorer l'efficacité de prise en charge et de pénétration des ARNm *in vivo*, des méthodes physiques telles que la biolistique, la microinjecton ou l'électroporation peuvent être utilisées.

Une étude ancienne a montré la fonctionnalité d'ARNm antigéniques complexés avec des particules d'or suite à une transfection des cellules par la technique de bombardement de gènes (ou biolistique ou *gene gun* en anglais)¹²⁹. Cette technique de *gene gun* consiste à propulser à grande vitesse un acide nucléique souvent couplé sur des microbilles de métal dans les cellules à l'aide d'un pistolet à gènes. Cette stratégie de transfert direct permet de réaliser des transfusions rapides de nombreuses cibles *in vitro* et *in vivo*¹³⁰, et a montré un intérêt dans le transfert des ARNm. Des résultats intéressants ont été obtenus chez les animaux par utilisation de cette technique¹³¹⁻¹³⁴. Chez la souris, ce type de délivrance a induit une réponse immunitaire à large spectre contre un flavivirus avec une activation des LT CD4+ de type TH1 mais aussi de LT cytotoxiques, comparable à celle obtenue avec des vaccins atténués ou inactivés. La simple administration d'1 µg a permis de protéger les souris pendant 1 an¹³⁴. Cependant, aucunes données prometteuses n'ont été reportées chez les primates et chez l'Homme.

L'électroporation est une technique qui consiste en la création de pores dans la membrane des cellules à l'aide d'un champ électrique de haute intensité permettant la pénétration des acides

Etude bibliographique

nucléiques présents à proximité¹³⁵. Initialement développée pour permettre la transfection de cellules *in vitro*, l'électroporation a ensuite été utilisée pour permettre d'augmenter la prise en charge des ARNm thérapeutiques par les DC *in vivo*¹³⁶⁻¹³⁸. Afin d'appliquer cette stratégie *in vivo*, l'électroporation est souvent associée à une méthode d'injection au niveau du derme ; l'ARNm antigénique va être administré aux souris par injection intradermique et immédiatement être électroporés à l'aide de dispositif adapté. Cette technique permet ainsi le ciblage des DC du derme et des cellules de Langerhans résidentes du tissu. Comme pour la délivrance par *gene gun*, de fortes réponses immunitaires à large spectre ont été obtenues suite à la délivrance d'ARNm par électroporation *in vivo*¹³⁶. Cependant, cette technique a permis d'obtenir des résultats intéressants uniquement avec un ARNm auto-répliatif.

D'autres techniques telles que la microinjection des ARNm peuvent également être utilisées. Cette technique consiste à injecter les acides nucléiques directement dans le compartiment intracellulaire¹³⁹.

Ces méthodes physiques sont essentiellement utilisées pour l'administration *ex vivo* des ARNm aux DC car l'accès direct aux tissus reste limité. C'est pourquoi des systèmes de délivrance basés sur l'utilisation de peptides, lipides ou polymères ont été développés.

c. Couplage à la protamine et peptides cationiques

La protamine est une protéine cationique qui a montré un réel avantage dans la protection des ARNm face aux dégradations par les RNAses¹⁴⁰. La complexation des ARNm avec la protamine semble préserver l'interaction avec les récepteurs TLR, comme indiqué par la stimulation de plusieurs types de cellules sanguines¹⁴¹. Ces ARNm complexés induisent des réponses T suite à des injections intradermiques. Néanmoins, le niveau d'expression de protéines et l'efficacité restent limitées. Ceci peut être dû à une interaction trop forte entre l'ARNm et la protamine^{142,143}.

La société CureVac a développé une plateforme vaccinale basée sur l'utilisation de la protamine pour la délivrance d'ARNm vaccinaux : la plateforme RNActive. L'utilisation de cette plateforme dans les vaccins permet d'améliorer le niveau d'expression des ARNm et favorise l'activation de la réponse immunitaire¹⁴⁴. Des réponses encourageantes ont été obtenues dans plusieurs essais précliniques et cliniques^{54,145}. En effet, dans le cas de la rage, l'immunisation de souris et de cochons avec la plateforme RNActive a permis l'induction d'une immunité protectrice¹⁴⁶. Chez l'Homme, ce vaccin a permis d'induire une réponse anticorps mais avec la détection d'effets secondaires au niveau systémique¹⁴⁷. Cependant, le RNActive agit principalement comme un adjuvant et non comme un vecteur à proprement parlé⁵².

Etude bibliographique

Le groupe de Bettinger *et al.* a démontré que l'utilisation de polymère cationique de faible poids moléculaire permet de diminuer la force de l'interaction entre le support et l'ARNm et que ceci permettait ainsi d'obtenir une expression efficace de l'ARNm¹⁴⁸. Cependant, l'utilisation de ce type de vecteur nécessite l'ajout d'un agent perturbateur des endosomes pour permettre l'échappement et la traduction de l'ARNm en protéine antigénique. Suite à ces observations, une équipe s'est intéressée aux peptides cationiques ayant une capacité de pénétration dans les cellules (les *cationic cell-penetrating peptides* ou CPP en anglais)¹⁴⁹. Ils ont supposé que ce type de peptides, utilisés dans le cas de la délivrance de protéines, d'ADN et de siARN¹⁵⁰⁻¹⁵², pouvait également permettre de véhiculer les ARNm tout en permettant l'échappement des endosomes. Cette équipe a alors décidé d'utiliser le peptide cationique amphipathique RALA composé d'une séquence riche en arginine : WEARLARALARALARHLARALARALARACEA. Ils ont démontré que le peptide RALA permettait de condenser l'ARNm antigénique sous forme de nanocomplexe. Ces derniers ont une capacité de perturbation des membranes en pH acide qui permet l'expression de la protéine dans le cytosol et la prolifération de lymphocytes T spécifiques¹⁴⁹.

d. Les vecteurs lipidiques

Au cours des dernières années, les lipides cationiques sont devenus les vecteurs de choix pour la délivrance des ARNm synthétisés *in vitro*. La complexation des acides nucléiques, chargés négativement, avec des lipides cationiques permet la formation spontanée de complexes types liposomes *via* des interactions électrostatiques. Ces structures sont en général préparées à partir de lipides comportant une tête polaire hydrophile et une queue non polaire hydrophobe qui permet de former des structures vésiculaires en présence de solution adaptée. Les liposomes sont particulièrement efficaces pour délivrer des molécules dans le cytosol des cellules cibles en fusionnant avec les membranes. De plus, ils présentent deux avantages majeurs. Premièrement, les ARNm se retrouvent condensés à l'intérieur des particules mimant les microorganismes résultant en une prise en charge efficace par les DC. Deuxièmement, la condensation des ARNm dans ces complexes les rend moins vulnérables aux enzymes de dégradation. Ces vecteurs peuvent être répartis en 3 catégories principales : les formulations basées sur le DOTAP (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane) ou lipoplexes, les agents commerciaux et les nanoparticules lipidiques ou LNP.

Lipoplexes

De manière historique, le DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-triméthylammonium propane) a été le premier lipide cationique utilisé pour la délivrance des ARNm. Ce lipide a permis de condenser un ARNm codant la luciférase et de transfecter efficacement plusieurs types cellulaires *in vitro*⁶⁵.

Etude bibliographique

Suite à ces résultats, le DOTAP, un dérivé du DOTMA moins cher à produire, a été testé et a permis d'obtenir de meilleures efficacités de transfection (**Figure 18**)^{60,153,154}.

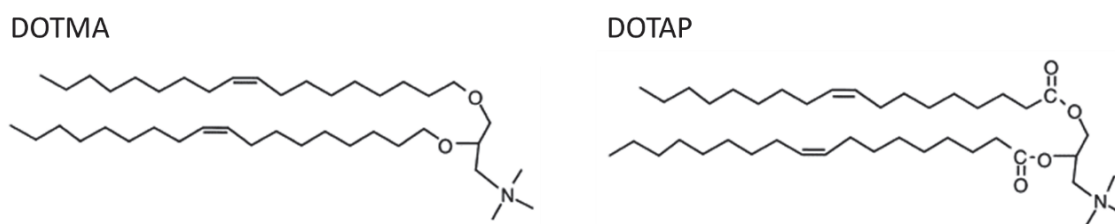


Figure 18 : Structure chimique du DOTMA et du DOTAP.

Par la suite, plusieurs équipes ont cherché à améliorer les formulations basées sur l'utilisation de DOTAP pour la délivrance des ARNm. Par exemple, l'ajout sur le DOTAP de cristaux de carbonate-apatite, connus pour leur affinité avec les acides nucléiques, favorise l'internalisation des ARNm dans les cellules. Cette modification a permis d'induire une augmentation de l'efficacité de transfection de DOTAP de 5 à 15 fois *in vitro*¹⁵⁵. Une autre stratégie pour améliorer la délivrance des ARNm à partir du DOTAP consiste en l'ajout d'un lipide favorisant l'échappement des endosomes : le DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine). Le DOPE est un des lipides le plus additionné aux lipides cationiques pour favoriser l'expression des ARNm vectorisés. Il permet une amélioration de la formation des liposomes et induit un réarrangement des membranes sous pH acide, ce qui favorise l'échappement des endosomes¹⁵⁶. L'utilisation de DOTAP-DOPE a montré de nombreux avantages en terme de transfection mais également pour l'induction de réponses cytotoxiques, notamment dans le cas de vaccin anti-VIH-1¹⁵⁷. Récemment, Kranz *et al.* a montré que des lipoplexes de DOTMA-DOPE vectorisant un ARNm codant pour l'antigène d'intérêt étaient capables de cibler les cellules dendritiques et d'induire une réponse de type IFN α , qui a été validée en clinique¹⁵⁸.

Bien que très attractifs pour la délivrance des ARNm, les vecteurs basés sur l'utilisation de lipides cationiques sont souvent associés à une certaine toxicité et une immunogénicité *in vitro* et *in vivo*¹⁵⁹. L'injection de lipides cationiques en intraveineuse conduit par exemple à des altérations au niveau du foie et induit une forte inflammation chez les souris²⁴. De plus, les charges positives des lipides tels que le DOTAP ou le DOTMA peuvent être neutralisées par les protéines anioniques du sérum, conduisant à l'agrégation des complexes et à une diminution de l'efficacité de ce type de vecteurs¹⁵⁹. La combinaison de ces lipides cationiques linéaires avec du polyéthylène glycol (PEG), un polymère non chargé, a permis de contrecarrer cet inconvénient. En effet, l'utilisation de ce polymère permet d'éviter les interactions avec les protéines du sérum et la formation d'agrégats^{24,160}.

L'utilisation de lipides ionisables est apparue comme une alternative à ces lipides cationiques afin de réduire la toxicité de ces derniers. Ces lipides ont tendance à être chargés positivement à pH faible, permettant ainsi l'interaction avec les ARNm en tampon acide et l'échappement des

Etude bibliographique

endosomes, mais sont chargés négativement à pH neutre, réduisant ainsi leur toxicité au niveau des sites d'injection²⁴.

Agents commerciaux

La grande efficacité de ces lipides cationiques pour la délivrance des ARNm a conduit au développement de nombreux agents transfectants basés sur leur utilisation pour favoriser la transfection des ARNm *in vitro*¹⁶¹ mais également *in vivo*^{70,79,161}. La lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) permet une expression prolongée de l'ARNm dans 90 % des cellules *in vitro*^{162,163}. De la même manière, le Stemfect (Stemgent) permet de transfecter efficacement les cellules dendritiques. Cependant cette étude montre l'avantage du format nanoparticulaire pour la délivrance aux cellules dendritiques¹⁶⁴.

Les nanoparticules lipidiques ou liponanoparticules (LNP)

Les nanoparticules lipidiques (LNP) sont devenues le vecteur de choix et la stratégie la plus utilisée pour la délivrance des ARNm. Les LNP sont constitués de 4 composants majeurs : un lipide cationique ionisable qui permet l'auto-assemblage en nanoparticules d'environ 100 nm et l'échappement des endosomes, un lipide associé au polyéthylène glycol (PEG) qui augmente la demi-vie des formulations en évitant l'interaction avec les protéines du sérum, du cholestérol pour la stabilisation de la structure et un phospholipide naturel stabilisant la bicouche lipidique de type liposomes. Les ratios de chaque composant dans les formulations sont propres à chaque groupe et modifient l'efficacité des LNP (Figure 19)²⁴.

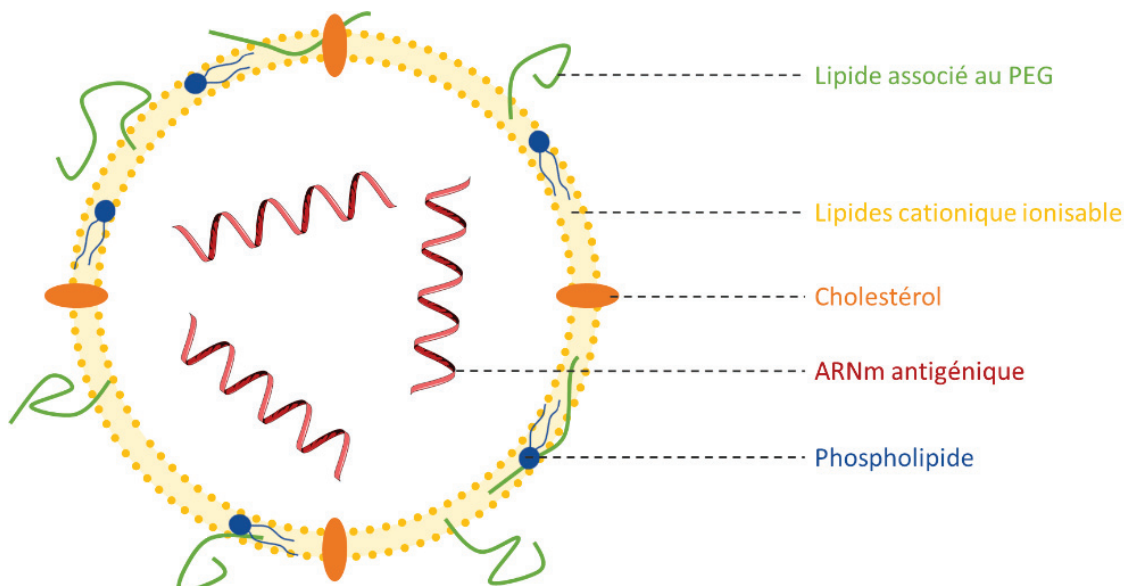


Figure 19 : Représentation schématique des liponanoparticules (LNP).

Les nanoparticules lipidiques sont formées de 4 composants majeurs renfermant l'ARNm antigénique : un lipide cationique ionisable, du cholestérol, un phospholipide et un lipide associé au PEG. Le lipide cationique ionisable permet la formation d'une structure type liposome qui va faciliter l'internalisation dans les cellules dendritiques et l'échappement des endosomes. Cette structure est stabilisée par la présence de cholestérol et de phospholipides. Le PEG permet quant à lui d'augmenter la demi-vie des LNP en évitant les interactions avec les protéines sériques.

Etude bibliographique

De très nombreuses études se sont intéressées à ce format de délivrance que ce soit pour des ARNm conventionnels ou auto-réplicatifs^{32,165}. L'administration de ces LNP en intradermique, intramusculaire et sous-cutané a conduit à l'expression prolongée de protéines au niveau des sites d'injection^{165,166}. Cette stratégie est très utilisée dans le domaine de l'immunothérapie anti-cancer où ces LNP permettent d'induire des réponses cytotoxiques avec réduction de la taille des tumeurs et une survie²³.

Dans le domaine de la vaccination contre les maladies infectieuses, l'induction d'un haut niveau de réponse immunitaire neutralisante avec une bonne tolérabilité a été reporté contre le virus Zika chez des souris ou des primates non-humains^{82,167}. Par utilisation de LNP, une immunisation en simple dose d'ARNm codant pour des protéines du virus Zika (à 30 ou 50 µg chez des souris ou des singes non-humanisés respectivement) a permis d'induire une protection chez les animaux¹⁶⁷. La société Moderna Therapeutics a montré une protection face à l'infection du virus Zika chez les souris suite à l'injection en intramusculaire de deux doses à 10 µg d'ARNm⁸². Cette société a également testé un vaccin contre la grippe où des souris immunisées avec de très faibles doses (0,4 µg d'ARNm) ont été protégées à un challenge avec une dose létale de virus¹⁶⁶. Ces analyses ont conduit à la réalisation d'un essai clinique de phase I contre la grippe chez l'Homme. Les patients ont reçu une simple injection d'ARNm codant un antigène du virus de la grippe ou un placebo en intramusculaire. Cette première étude chez l'Homme confirme l'induction d'une réponse immunitaire protectrice avec une bonne tolérabilité du vaccin¹⁶⁶.

e. Les nanovecteurs polymériques

Bien que leur utilisation soit moins avancée que celle des lipides cationiques, les polymères représentent une approche prometteuse pour la délivrance des ARNm. Les polymères présentent certains avantages pour la délivrance de vaccins. En effet, ces derniers sont faciles à générer et offrent une grande variabilité au niveau de modifications structurales. De plus, ils ont une bonne biodégradabilité dans l'organisme associée à une faible toxicité. Depuis, de nombreux polymères ont été utilisés pour le développement de systèmes permettant la délivrance d'antigènes et notamment d'ADN et de siARN. Cette recherche est actuellement mise à profit pour la délivrance d'ARNm dans le contexte de la vaccination.

La complexation des ARNm antigéniques chargés négativement avec les polymères cationiques se fait par interactions électrostatiques. Cette liaison permet la formation de complexe qui présentent une grande stabilité, souvent plus importante que celle observée avec les lipides cationiques. Ces polymères permettent non seulement de condenser l'ARNm en nanostructures

Etude bibliographique

prises en charge par les cellules de manière plus aisée, mais aussi de le protéger face aux dégradations et de favoriser son relargage dans le cytosol¹⁶⁸.

Les polymères cationiques linéaires

Le premier rapport montrant l'intérêt de polymère pour la délivrance d'ARNm remonte à 1973 avec l'utilisation de dextran¹⁶⁹. C'est ensuite en 2001 que le groupe de Bettinger s'est intéressé aux polymères tels que la poly-L-lysine, le PEI ou encore les dendrimères, pour la délivrance des ARNm¹⁴⁸.

La polylysine a été le premier polymère cationique utilisé pour transférer des cellules¹⁷⁰. Actuellement, le polyéthylèneimine (PEI), sous forme branchée ou linéaire (**Figure 20**), est le polymère cationique le plus utilisé dans les vaccins à acides nucléiques¹⁷¹. Ce polymère est notamment utilisé dans la composition d'agents de transfection tel que l'ExGen 500 (Fermentas Life Sciences) ou le JetPEI (Polyplus Transfection). L'utilisation de PEI permet de condenser l'ARN et de favoriser la protection des acides nucléiques face aux dégradations^{163,172} et a montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* pour la délivrance d'ADN¹⁷³, mais également d'ARNm¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Cependant, ce polymère associé aux ARNm induit une expression des protéines plus faible que celle observée par la vectorisation d'ADN¹⁴⁸. De plus, le PEI présente une forte toxicité notamment associée au poids moléculaire élevé (> à 20 kDa), aux ramifications des formulations et au PEI libre restant après formation de complexes¹⁷⁷. De plus, comme pour les formulations à base de lipides cationiques, l'interaction entre les charges positives du polymère et les protéines sériques chargées négativement provoque une agrégation qui altère leur efficacité¹⁵⁹.

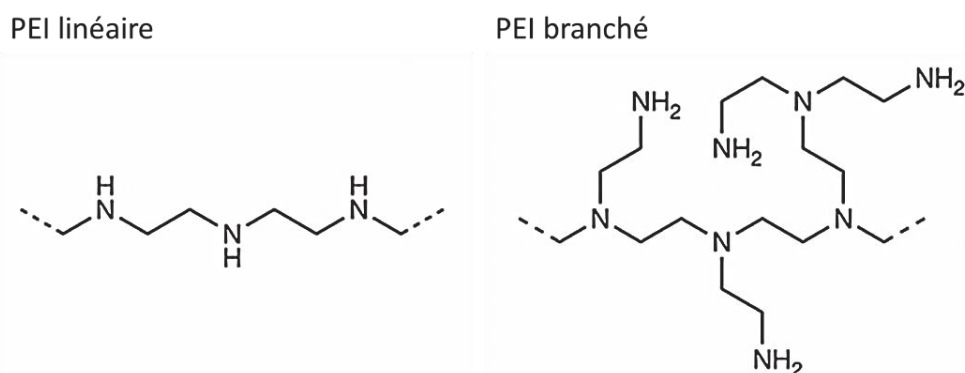


Figure 20 : Structure chimique du PEI linéaire et branché.

Afin de diminuer la toxicité induite par le haut poids moléculaire, certains groupes ont utilisé un polymère de PEI synthétique de faible poids moléculaire (2 kDa) pour la délivrance des ARNm. L'utilisation de ces polymères de faible poids moléculaire permet une interaction plus faible qui résulte en une augmentation de l'expression des ARNm¹⁴⁸. En utilisant cette approche, un ARNm codant pour l'antigène gag du VIH-1 injecté en sous-cutané a activé une réponse anticorps chez des souris¹⁷⁴. De la même manière, un PEI de 2kDa couplé à la cyclodextrine a permis d'induire une

Etude bibliographique

réponse systémique et muqueuse suite à une administration intranasale d'un ARNm antigénique anti-VIH¹⁷⁸.

Plusieurs études se sont intéressées à la complexation du PEI avec d'autres polymères ou molécules afin d'augmenter l'efficacité de transfection et de diminuer la toxicité de ce dernier. Le couplage du PEI avec la poly-L-lysine, la cyclodextrine ou le polyéthylène glycol (PEG) a montré une efficacité de transfection augmentée en comparaison au PEI seul^{175,179}. De plus, la présence de la cyclodextrine permet de stimuler les DC au niveau du ganglion lymphatique avec une toxicité moindre que le PEI seul¹⁷⁹. Le groupe de Lisziewicz a développé un vaccin à ADN contre le VIH basé sur l'utilisation de PEI couplé à des résidus mannoses (DermaVir) qui a permis la réduction de la charge virale chez des macaques et est actuellement testé dans un essai clinique de phase II¹⁸⁰.

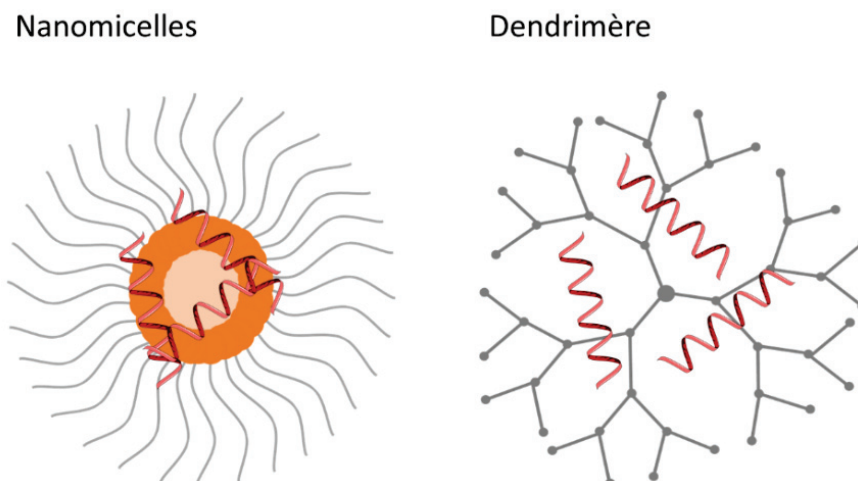
Après internalisation dans les cellules, la libération des complexes présents dans les vésicules d'endocytose est une étape essentielle pour permettre une expression de l'ARNm dans le cytosol. Le pH acide des endosomes est dû à l'action d'une ATPase à protons qui les concentre à l'intérieur des vésicules endosomales et lysosomales. Le PEI possède des amines secondaires protonables en milieu acide qui sont capables de capter les H⁺ dans les endosomes, ce qui permet de déstabiliser les membranes des endosomes par un effet tampon, aussi appelé éponge à protons¹¹². De plus, il a été montré que l'utilisation d'un PEI linéaire substitué par des résidus histidine pour la délivrance d'acide nucléique induit une efficacité de transfection de différentes lignées cellulaires mais une toxicité *in vitro* diminuée par rapport au PEI linéaire¹⁷². Ce PEI histidinylé permet de condenser les ARNm de grande taille tels que les ARN auto-réplicatifs¹⁷⁶. Dans une étude récente, un ARNm auto-réplicatif codant pour l'hémagglutinine formulé dans du PEI contenant des histidines a permis l'induction d'une réponse immunitaire protectrice face à la grippe saisonnière chez des souris³⁴. De la même manière, le greffage de résidus histidine sur la poly-lysine permet d'augmenter très fortement l'efficacité de transfection par rapport à la poly-lysine nue¹⁸¹. Cette efficacité de transfection est fortement inhibée en présence de bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à protons endosomale. Ceci montre que la protonation du noyau imidazole des histidines est impliquée dans la transfection et probablement dans la délivrance de l'ARN au cytosol. En plus de l'effet éponge à protons, les résidus histidine pourraient également avoir un effet perméabilisant ou fusiogène en milieu acide¹⁸².

Les nanomicelles et dendrimères polymériques

Comme alternative au PEI, les polymères auto-assemblés en micelles ou en dendrimères sont apparus également prometteurs pour la délivrance des ARNm (**Figure 21**).

Les nanomicelles sont constituées de copolymères amphiphiles permettant la formation d'un noyau interne et d'une couronne de bras ou inversement en fonction du solvant présent. La taille et le

nombre de bras sont régis par la balance hydrophile / hydrophobe des copolymères. Les antigènes peuvent être encapsulés dans le noyau ou couplés à la surface des bras¹⁸³.



Utilisé dans le développement de vaccins à ADN, ces nanomicelles polymériques ont permis d'obtenir des réponses immunitaires chez la souris dans le cas de la délivrance d'ARNm. La délivrance d'un ARNm codant l'antigène gag du VIH-1 *via* des nanomicelles de PEI / acide stéarique a permis d'augmenter significativement la réponse immunitaire par rapport à un polyplexe de PEI seul¹⁷⁴. Le polymère pAsp(DET) (poly (N'-(N-(2-aminoéthyl) -2-aminoéthyl) aspartamide) souvent combiné au PEG est notamment utilisé pour la délivrance des ARNm sous ce format. Les complexes PEG / pAsp(DET) et PEG / pAsp(TEP) ont notamment été utilisés pour la formulation d'un ARNm dans le cas de thérapies anti-cancéreuses^{24,184}. Des analyses sur souris ont montré que l'ajout de cholestérol à ces micelles permettait d'améliorer les effets de ces nanomicelles dans l'induction de réponses immunitaires¹⁸⁴. La stabilisation des nanomicelles semble ainsi essentielle à la délivrance et la fonctionnalité des ARNm.

Les dendrimères de polymères ont également montré un intérêt pour la génération de réponses immunitaires dans des applications vaccinales. Les dendrimères sont des molécules de monomères de polymère associées sous une forme arborescente. Cette arborescence leur confère la capacité de vectoriser des antigènes, et notamment des ARNm. Des dendrimères ont permis l'induction de réponses cytotoxiques T CD8+ et d'anticorps suite à l'injection en simple dose de divers ARNm auto-réplicatifs. Ces réponses ont conduit à la protection des souris dans le cas de la grippe H1N1, du virus Ebola et de la toxoplasmose¹⁸⁵. Cependant, ces structures sont souvent associées à une forte toxicité. De plus, l'utilisation de lipides cationiques semble plus efficace que les polymères en terme de capacité de transfection^{162,169}. En effet, l'utilisation de divers polymères pour la transfection de cellules, telles que la poly-L-lysine, le PEI ou les dendrimères conduisent à une faible capacité de

Etude bibliographique

transfection¹⁴⁸. Ceci peut être dû à une affinité trop forte entre les acides nucléiques et le polymère, empêchant le relargage dans le cytosol¹⁶².

L'utilisation des nanoparticules polymériques pour la délivrance des ARNm n'en est qu'à ses débuts mais a montré un grand potentiel. Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant le délivrance d'ARNm à partir de nanoparticules (NP) polymériques de poly(acide lactique) (PLA) ou de poly(acide-lactique-co-glycotique) (PLGA). Ces polymères, tous deux approuvés par la FDA pour diverses applications médicales, ont été largement étudiés pour la délivrance de protéines et de peptides, mais également d'adjuvants¹⁸⁶. L'utilisation de ce type de polymère pour la délivrance des ARNm constitue donc un challenge dans le domaine de la vaccination.

L'ensemble de ces stratégies de délivrance a été testé sur plusieurs animaux modèles et chez l'Homme dans le cadre de thérapies anticancéreuses ou contre des maladies infectieuses. Ces systèmes de délivrance des ARNm pour une utilisation *in vivo* sont résumés dans le **Tableau II**.

Tableau II : Principales stratégies de délivrance des ARNm *in vivo* (Adapté de Pardi *et al.* 2018²³).

OVA : Ovalbumine ; *HCV* : Virus de l'Hépatite C ; *HCMV* : Virus du Cytomégalo virus Humain ; *HPV* : Papillomavirus Humain ; *RSV* : Virus respiratoire syncytial
Types d'injection : *i.d.* : injection intradermique ; *i.n.* : injection intranodale ; *i.v.* : injection intraveineuse ; *s.c.* : injection sous cutanée

Système de délivrance	Voie d'administration	Espèces	Cible
Agent transfectants	<i>i.n.</i>	Souris	OVA ¹⁸⁷
Protamine	<i>i.d.</i>	Souris, furet, cochon et Homme	Virus de la grippe ^{38,52} , Mélanome ¹⁸⁸ , Cancer du poumon ¹⁸⁹ , Cancer de la prostate ^{52,142,145} , rage ¹⁴⁶ , OVA ^{52,142}
Liposomes / Protamine	<i>i.v.</i>	Souris	Cancer du poumon
Particules de polysaccharide	<i>s.c.</i>	Souris et lapin	Virus de la grippe
Nanoémulsions cationiques	<i>i.m.</i>	Souris, lapin, furet et macaques	Virus de la grippe ¹⁹⁰ , RSV ⁴⁸ , VIH-1 ^{48,191} , HCMV ⁴⁸ , HCV et rage ²⁸
Polymères cationiques	<i>s.c.</i> et <i>i.n.</i>	Souris	Virus de la grippe ¹⁷⁶ et VIH-1 ^{174,178}
Liposomes / Polymères cationiques	<i>i.v.</i>	Souris	Mélanome ¹⁹² et cancer pancréatique ¹⁸⁴
NP de lipides cationiques	<i>i.d.</i> , <i>i.v.</i> et <i>s.c.</i>	Souris	VIH-1 ¹⁵⁷ et OVA
NP de lipides cationiques / cholestérol	<i>i.v.</i> , <i>s.c.</i> et <i>i.n.</i>	Souris	Virus de la grippe ¹⁵⁸ , mélanome ¹⁵⁸ , Leucémie, OVA, HPV et Cancer du colon ¹⁵⁸
LNP	<i>i.d.</i> , <i>i.m.</i> et <i>s.c.</i>	Souris, rat, macaques et Homme	Virus Zika ^{82,167,193} , Virus de la grippe ^{166,190,194} , RSV ³² , HCMV, rage ²⁸ et mélanome
Dendrimères	<i>i.m.</i>	Souris	Virus de la grippe, Virus Ebola, Toxoplasmose ¹⁸⁵ et Virus Zika ¹⁹⁵

2. Administration des ARNm aux cellules dendritiques

Pour la délivrance des ARNm aux cellules dendritiques par des vecteurs non viraux, deux stratégies majeures ont été décrites. La première est basée sur le chargement des ARNm dans les DC *ex vivo*, puis à la réinjection de ces DC chargées chez un même patient. La deuxième approche consiste en l'injection parentérale des ARNm avec ou sans vecteurs²³. La délivrance des ARNm *ex vivo* dans les DC permet de contrôler de manière précise la transfection des cellules d'intérêt. Cependant cette approche est reconnue comme une thérapie cellulaire, et c'est une technique coûteuse et difficile à appliquer dans le cadre de la vaccination¹⁰¹. L'injection directe des ARNm en parentéral est quant à elle plus rapide et rentable, mais permet un ciblage moins spécifique malgré de récents progrès. L'ensemble de ces approches a été analysé avec une variété de systèmes de délivrance décrits précédemment.

a. Chargement des DC *ex vivo*

Le chargement des DC *ex vivo* consiste à faire pénétrer un antigène *in vitro* dans des cellules provenant de cultures de cellules d'un patient, puis à réinjecter chez ce même patient ces cellules chargées. Cette technique a été utilisée chez des patients perfusés avec des DC autologues dérivés *ex vivo* de monocytes ou de cellules souches et chargés avec des antigènes variés comme des protéines, des peptides, des virus inactivés ou des protéines recombinantes¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. De la même manière, l'utilisation d'ARNm codant un antigène pour transfecter des DC *ex vivo* peut présenter de multiples avantages¹⁹⁹. La plupart des essais cliniques mis en place dans le cadre de thérapies à ARNm au cours des 20 dernières années ont été réalisés par utilisation de cette stratégie (**Tableau III**). Ces essais ont été réalisés essentiellement dans le cadre d'immunothérapies cancéreuses ou dans le cas de vaccins thérapeutiques, notamment dirigés contre le VIH-1.

Pour permettre le chargement des antigènes *ex vivo*, plusieurs techniques peuvent être utilisées. La transfection *ex vivo* par électroporation a montré un réel avantage. La création de ces pores permet l'entrée des ARNm directement dans le cytoplasme des cellules. Cette approche permet de transfecter les cellules dendritiques avec une très forte efficacité sans avoir recours à des agents transfectants ; plus de 75 % des DC sont en effet transfectées suite à la réalisation d'électroporation *in vitro*²⁰⁰. L'électroporation des DC par des ARNm est une technique sûre et simple. C'est pourquoi, la grande majorité des essais cliniques pour lesquels les antigènes ont été administrés sous forme d'ARNm ont été réalisés avec des DC autologues chargées par électroporation puis ré-administrées aux patients après culture *ex vivo*. Cette stratégie de chargement *ex vivo* a été très largement utilisée dans le cas de traitements contre les cancers, notamment pour le traitement de leucémies, de cancers colorectaux ou du cerveau et de mélanomes^{23,101}. En effet, de nombreux essais cliniques utilisent des

Etude bibliographique

DC autologue chargées avec des ARNm codants pour des antigènes associés aux tumeurs (TAA) pour induire des réponses cytotoxiques permettant la lyses des cellules cancéreuses¹⁰¹. Ces essais ont permis de mettre en évidence des réponses cytotoxiques suite à la réalisation de traitements par cette stratégie. Par exemple, l'administration intranodale de DC chargées avec des ARNm gp100 ou tyrosinase a permis d'induire une expression des antigènes TAA dans le ganglion lymphatique et de déclencher des réponses cytotoxiques spécifiques chez des patients atteints de mélanome²⁰¹. De manière identique, dans une étude clinique de phase I/II, il a été montré que l'injection de DC autologues chargées d'ARNm tumoraux en intranodal et/ou intradermique est capable d'induire la prolifération de lymphocytes T circulants avec une sécrétion d'IFN- γ chez 50 % des patients atteints de mélanome, mais sans toutefois observer de bénéfices cliniques²⁰².

Des résultats intéressants ont également été obtenus dans le cas de maladies infectieuses. La transfection de MoDC par de l'ARNm codant l'épitope immunodominant pp65 du cytomegalovirus humain a permis la stimulation de lymphocytes T CD4+ et CD8+ prélevés à des patients *in vitro*³⁵. De plus, dans le cas de traitement anti-VIH, plusieurs études cliniques ont montré la capacité de cette stratégie à induire des réponses immunitaires à large spectre spécifiques de l'antigène du VIH, mais sans observer de réels bénéfices cliniques^{203–208}.

Tableau III : Principaux essais cliniques utilisant la technique de chargement des DC *ex vivo*

(Adapté de Pardi *et al.* 2018²³).

Ce tableau résume les essais cliniques enregistrés sur le site ClinicalTrials.gov le 5 mai 2017.

AML : leucémie myéloïde aigue ; Ag : antigène ; aug. : augmentation ; CML : leucémie myéloïde chronique ; CMV : cytomegalovirus ; CTL : Lymphocytes T cytotoxiques ; DC : cellules dendritiques ; EP : électroporé ; ND : non déterminé ; Rép. : réponse ; TAA : antigène associé à la tumeur ; Types d'injection : i.d. : injection intradermique ; i.n. : injection intranodale ; i.v. : injection intraveineuse ; s.c. : injection sous cutanée. En vert les essais cliniques contre des maladies infectieuses.

Compagnies	Type de vaccin (Voie d'administration)	Cibles	Numéro d'essai clinique (Phase)	Statuts Références	Résultats
Antwerp University Hospital	DC EP par un ARNm TAA (i.d. ou ND)	AML	NCT00834002 (I) NCT01686334 (II)	Terminé ²⁰⁹ Recrutement	Vaccin toléré
		AML, CML, Myélome	NCT00965224 (II)	ND	
		Multiple tumeurs	NCT01291420 (I/II)	ND	
		Mésothéliome	NCT02649829 (I/II)	Recrutement	
		Glioblastome	NCT02649582 (I/II)	Recrutement	
Argos Therapeutics	DC EP par un ARNm tumoral (i.d. ou ND)	Cancer rénal	NCT01482949 (II) NCT00678119 (II) NCT00272649 (I/II) NCT01582672 (III) NCT00087984 (I/II)	En cours Terminé ²¹⁰ Terminé ; résultats ND En cours Terminé ; résultats ND	CTL, aug. survie
			Cancer du pancréas	NCT00664482 (NA)	Terminé ; Résultats ND
		DC EP par un ARNm viral (i.d.)	HIV-1	NCT00672191 (II) NCT01069809 (II) NCT02042248 (I)	Terminé ²⁰⁷ Terminé ; résultats ND Terminé ; résultats ND
Asterias Biotherapeutics	DC chargé avec un ARNm TAA (ND)	AML	NCT00510133 (II)	Terminé ²¹¹	Rép. T spécifique ; aug. survie
Duke University	DC chargé avec un Ag du CMV (i.d. ou i.n.)	Glioblastome et gliome	NCT00626483 (I) NCT00639639 (I)	En cours	

Etude bibliographique

			NCT02529072 (I) NCT02366728 (II)	En cours Recrutement Recrutement	
	DC chargé avec un ARNm tumoral (i.d.)	Glioblastome	NCT00890032 (I)	Terminé ; résultats ND	
	DC chargé avec un ARNm TAA (i.n.)	Mélanome	NCT01216436 (I)	Interrompu	
Erasmus Medical Center	DC chargé avec un ARNm Trimix (i.n.)	VIH-1	NCT02888756 (II)	Recrutement	
Guangdong 999 Brain Hospital	DC chargé avec un ARNm TAA (NA)	Glioblastome	NCT02808364 (I/II) NCT02709616 (I/II)	Recrutement Recrutement	
		Métastase du cerveau	NCT02808416 (I/II)	Recrutement	
Herlev Hospital	DC chargé avec un ARNm TAA (i.d.)	Cancer du sein et mélanome	NCT00978913 (I)	Terminé ²¹²	Vaccin toléré, Rép. sur 41% des patients
		Cancer de la prostate	NCT01446731 (II)	Terminé ²¹³	Vaccin toléré, Rép. T sur 50% des patients
Life Research Technologies GmbH	DC chargé avec ARNm TAA (ND)	Cancer des ovaires	NCT01456065 (I)	ND	
Ludwig-Maximilian-University of Munich	DC chargé avec un ARNm TAA ou issus du CMV (i.d.)	AML	NCT01734304 (I/II)	Recrutement	
Massachusetts General Hospital	DC chargé avec un ARNm antigénique	VIH-1	NCT00833781 (II)	Terminé ²⁰⁶	Pas de rép. IFN-γ ; Aug. des CD4 courte
McGill University Health Centre	DC EP par un ARNm viral (i.d.)	VIH-1	NCT00381212 (I/II)	Terminé ²⁰⁴	Preuve de concept validé ; passage en phase II
MD Anderson Cancer Center	DC chargé avec un ARNm (ND)	AML	NCT00514189 (I)	Interrompu	
Memorial Sloan Kettering Cancer Center	DC (Langerhans) EP par un ARNm TAA (i.d.)	Mélanome	NCT01456104 (I)	En cours	
		Myélomes	NCT01995708 (I)	Recrutement	
Oslo University Hospital	DC chargé avec un ARNm tumoral (i.d. ou ND)	Mélanome	NCT00961844 (I/II) NCT01278940 (I/II)	Interrompu Terminé ^{202,214}	Vaccin toléré ; Rep. T spécifique durable chez 50 % des patients ; Survie
		Cancer de la prostate	NCT01197625 (I/II) NCT01278914 (I/II)	Recrutement Terminé ; Résultats ND	
		Glioblastome	NCT00846456 (I/II)	Terminé ²¹⁵	Vaccins toléré, Rep T spécifique ; Suivie
		Cancer des ovaires	NCT01334047 (I/II)	Interrompu	
Radboud University	DC EP par un ARNm TAA (i.d., i.v. ou i.n.)	Cancer colorectal	NCT00228189 (I/II)	Terminé ²¹⁶	Rép. identique au vaccin peptidique
		Mélanome	NCT00929019 (I/II) NCT00243529 (I/II)	Interrompu Terminé ^{217,218}	Rep. T chez 29 % des patients ; Survie
			NCT00940004 (I/II) NCT01530698 (I/II) NCT02285413 (II)	Terminé ^{218,219} Terminé ²¹⁸⁻²²⁰ Terminé ; Résultats ND	Rep. T mais toxicité Rep. limitée
Universitair Ziekenhuis Brussel	DC EP par un ARNm TAA ou TriMix (i.d. et i.v.)	Mélanome	NCT01066390 (I)	Terminé ²²¹	Vaccin toléré ; Rep. anti-tumoral
			NCT01302496 (II)	Terminé ²²²	Vaccin toléré ; Rep anti-tumoral
			NCT01676779 (II)	Terminé ; résultats ND	
University Hospital Erlangen	DC chargé avec un ARNm tumoral (i.v.)	Mélanome	NCT01983748 (III)	Recrutement	
University of Campinas, Brazil	DC chargé avec un ARNm TAA (ND)	AML	NCT03083054 (I/II)	Recrutement	
University of Florida	DC chargé avec un ARNm du CMV (i.d.)	Glioblastome et myélome	NCT02465268 (II)	Recrutement	

Etude bibliographique

Cette stratégie de vaccination, bien que très utilisée, ne permet pas de vacciner la population à grande échelle. En effet, cette méthode est nécessairement personnalisée et coûteuse puisque les DC sont prélevées, traitées et réinjectées chez un même patient.

*b. Administration directe des vaccins à ARNm *in vivo**

L'injection directe d'ARNm vaccinaux représente le format le plus simple et économique pour la vaccination, notamment dans les pays ayant des ressources limitées. Pour cette stratégie, le choix de la voie d'administration est un des paramètres les plus importants. En effet, la stratégie employée va influencer sur le devenir de l'antigène et le type de réponse immunitaire générée. Le groupe de Pardi *et al.* a analysé par une technique d'imagerie *in vivo* l'expression et la biodistribution de la luciférase suite à l'administration de l'ARNm correspondant couplé à des lipides par différentes voies, à savoir par administration intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire, intradermique et intratrachéal¹⁶⁵. A dose égale, l'expression de l'ARNm administré *via* différentes voies dure plus ou moins longtemps, allant de 2 jours à 9 jours d'expression. Par exemple, les injections en intramusculaire et en intradermique résultent en une traduction de la protéine sur une longue période, avec une diminution graduelle du taux de protéine. Au contraire, les administrations par voie intraveineuse induisent des réponses très courtes. De plus, en fonction de la voie de délivrance, la protéine peut être exprimée au niveau du site d'injection ou être disséminée jusqu'aux organes lymphoïdes. En effet, les administrations en intradermique et sous-cutanée résultent en une expression sur le site d'injection, alors que pour les autres voies la protéine est exprimée essentiellement au niveau du foie¹⁶⁵.

Par conséquent, le choix de la voie d'administration des ARNm est déterminant dans l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. Plusieurs voies d'administration ont été testées dans le développement de vaccins à ARNm.

Délivrance en intradermique et sous-cutanée

La peau constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et contient les cellules clés dans l'induction de l'immunité et notamment les cellules dendritiques. Pour cette raison, l'administration par voie intradermique et sous-cutanée a été au centre des intérêts pour la délivrance des ARNm pendant de nombreuses années.

L'injection intradermique d'un ARNm nu en présence de Ringer lactate, une solution de perfusion contenant du chlorure de sodium et d'autres ions, a montré que la prise en charge par les DC était possible, mais dépendante de la présence de calcium. La présence de Ringer lactate et notamment de calcium peut en effet induire la formation d'agrégats, créant des structures particulières qui augmentent la prise en charge par les cellules²²³. L'endocytose des ARNm par les DC du derme

Etude bibliographique

a lieu par un mécanisme de macropinocytose, ce qui semble être une des clés de l'induction des réponses induites. De manière intéressante, l'équipe de Phua *et al.* a montré que l'injection sous-cutanée d'ARNm nu (en présence de Ringer lactate) permet d'induire une réponse plus soutenue que la délivrance d'ARNm dans un format nanoparticulaire¹⁶⁴. De la même manière, l'administration en sous-cutanée d'un ARNm codant pour l'antigène gag du VIH-1 *via* des formulations de DOTAP/DOPE ou de PEI a généré des réponses CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques^{157,174}. Cependant, l'injection d'ARNm vectorisés dans des formulations en intradermique a montré un niveau d'expression des antigènes élevé. Ces résultats ont été obtenus grâce à des complexes formés par utilisation de protamine et de lipides cationiques¹⁴⁰.

Le potentiel de l'administration intradermique de vaccins à ARNm est étayé par le succès de nombreuses études précliniques et la réalisation de plusieurs essais cliniques²³.

Administration intramusculaire

Ce type de délivrance permet d'avoir une expression longue de l'antigène. Cependant, il est important de prendre en compte la profondeur du site d'injection dans le muscle. En effet, il a été montré qu'une injection des ARNm au niveau superficiel des muscles conduisait à une expression de la protéine sur le site d'injection, alors qu'une injection plus profonde entraînait une expression disséminée et notamment au niveau du foie¹⁶⁵.

Le groupe de Geall *et al.* a développé un vaccin basé sur l'utilisation d'ARNm auto-répliquatif formulé par les nanoparticules lipidiques ou des nanoémulsions. Injecté au niveau intramusculaire à faible dose, l'ARNm antigénique permet d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le virus respiratoire syntythial (VRS) et le virus de la grippe chez les souris^{32,190}, mais aussi contre le VRS et le cytomégalo virus chez le primate non-humain⁴⁸.

Injection intranodale

Une autre voie d'entrée intéressante pour le développement de vaccins à ARNm est la délivrance des ARNm en intranodal. Ce type de délivrance se fait par injection directe des ARNm au niveau des ganglions lymphatiques drainants. Cette voie d'entrée permet ainsi de cibler directement les DC résidentes de ces organes lymphoïdes secondaires et d'induire des réponses immunitaires humorales et cytotoxiques^{124,224}. Une étude de biodistribution a montré que l'injection directe en intranodale permet d'augmenter de 100 fois la quantité d'ARNm dans cet organe par rapport à une injection réalisée à proximité de ce dernier²²⁵. Les ARNm injectés de manière directe dans les ganglions semblent en effet être pris en charge rapidement par les DC CD11c⁺ résidentes selon un mécanisme de macropinocytose et induisent leur activation²²⁴. Le groupe de Sahin *et al.* a comparé différentes voies d'administration d'ARNm nus et a montré que l'injection directe d'ARNm dans les

Etude bibliographique

ganglions lymphatiques permet d'induire une réponse immunitaire de type T_{H1} spécifique⁶⁸. Cependant, comme pour les injections intradermiques, il semble que les ARNm nus soient moins bien pris en charge par les cellules que lorsqu'ils sont associés. En effet, la présence de Ringer lactate, permettant une agrégation des ARNm, a également montré un avantage dans la prise en charge de ces derniers²²⁶. De plus, l'utilisation d'ARNm couplés au Trimix, un adjuvant vaccinal, a permis l'induction de lymphocytes T CD8⁺ ayant la capacité de migrer au niveau des lésions tumorales suite à une injection intranodale chez la souris⁵⁰.

Ce type d'administration intranodale est actuellement testé dans plusieurs essais cliniques, notamment dans le cadre de vaccins anti-tumoraux essentiellement²³. Cependant, le principal inconvénient de l'injection intranodale est la nécessité d'une intervention chirurgicale pour permettre une injection précise des ARNm vaccinaux. Bien que de nouvelles stratégies sont à l'étude pour cibler les ganglions lymphatiques drainants à partir d'une injection sous-cutanée, l'application de ce type de vaccins à grande échelle semble peu réalisable²²⁷.

Injection systémique en intraveineuse

L'administration en systémique ne représente pas la voie la plus communément utilisée dans le domaine des vaccins à ARNm. En effet, les risques d'agrégation avec les protéines du sérum et de dégradation nécessitent l'utilisation de systèmes de protection pour les ARNm. De plus, un autre point critique avec cette voie d'administration concerne la biodistribution du vaccin suite à l'injection. Les ARNm injectés dans la circulation sanguine semblent cibler les DC présentes dans les organes lymphoïdes, et notamment du foie et de la rate^{158,164,165,228}. Ces données ont été confirmées par une étude réalisée par Phua *et al.*, montrant que l'injection systémique d'un ARNm codant la luciférase vectorisé par des nanoparticules lipidiques de Stemfect permettait l'expression de la protéine au niveau de la rate, mais seulement sur une courte durée¹⁶⁴. En effet, l'administration *via* la voie systémique conduit à une expression bien plus courte que celle obtenue suite à une administration en intradermique ou en intramusculaire¹⁶⁵. Cependant, des rapports récents ont montré qu'une administration systémique de particules lipidiques vectorisant des ARNm entraînait une forte réponse cytotoxique^{158,228}. L'injection d'ARNm sous la forme de lipoplexes de DOTAP/DOPE en intraveineuse chez des souris a aussi permis d'induire une forte réponse cytotoxique conduisant à une diminution de la progression tumorale¹⁵⁸.

L'utilisation de cette voie d'administration est peu utilisée dans le cas de vaccins à ARNm et seulement deux essais cliniques ont été mis en place en utilisant cette stratégie dans le cas de mélanome avancé et de cancer du sein.

Administration muqueuses

Les muqueuses sont les tissus recouvrant les cavités ouvertes sur le milieu extérieur et sont majoritairement représentées par le tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital. Situées à l'interface entre l'organisme et l'environnement, les muqueuses sont donc en contact direct avec les agents infectieux et sont par conséquent exposées à de nombreuses infections par des micro-organismes pathogènes. Il a en effet été estimé que 70 % des agents infectieux pénètrent dans l'organisme par cette voie²²⁹.

La délivrance d'ARNm vectorisés par des nanoparticules lipidiques en intranasal a montré un intérêt particulier chez la souris. En effet, suite à des administrations intranasales, il a été montré que l'ARNm était rapidement exprimé chez les souris¹⁶⁴. De plus, le même groupe a mis en évidence l'induction d'une réponse humorale et cytotoxique dans le cas de tumeur *in vivo* par ce type d'immunisation¹⁸⁷. Cependant, il est important de remarquer que ces réponses n'ont été obtenues qu'avec un ARNm délivré sous format nanoparticulaire et non sous forme libre, que ce soit avec des agents lipidiques^{164,187} ou polymériques¹⁷⁹.

L'administration des ARNm vaccinaux aux poumons peut être réalisée par instillation directe en intratrachéal ou par inhalation d'aérosol grâce à la nébulisation. La nébulisation d'un ARNm modèle vectorisé par un polymère cationique a montré une efficacité de transfection de cellules *in vitro*¹⁶³. Ce type d'administration peut être un moyen de vaccination intéressant dans le cas de cancer des poumons, ou encore de vaccins contre des maladies infectieuses dont les voies pulmonaires sont impactées, comme dans le cas de la grippe.

Comme décrit précédemment, le choix de la voie d'administration influence le niveau et le site d'expression de l'ARNm, conduisant à des réponses immunitaires variées. Il a été suggéré que la combinaison de voies d'administrations puisse permettre d'induire des réponses immunitaires plus robustes, en générant une activation des T CD8⁺ au niveau de sites variés. En effet, une étude a montré que la combinaison de l'administration en intraveineuse et intradermique d'un ARNm modifié par le TriMix donnait des réponses T plus importantes que dans le cas d'injection exclusivement au niveau intradermique, chez des patients atteints de mélanome²³⁰.

Administrations directes des ARNm et essais cliniques :

L'injection directe *in vivo* des ARNm est prometteuse dans le domaine de la vaccination. Cette stratégie de vaccination a montré une bonne tolérabilité et sûreté des vaccins dans plusieurs modèles animaux et chez l'Homme. De plus, ce format de délivrance a permis d'induire des réponses de types CD8⁺ et CD4⁺^{23,28}, même suite à des administrations en quantité réduite et en simple doses^{82,166,167}. Les résultats encourageants obtenus chez les animaux ont conduit à la réalisation de plusieurs essais

Etude bibliographique

cliniques dans les domaines de l'immunothérapie cancéreuse et contre des maladies infectieuses (**Tableau VI**).

La société Moderna Therapeutic a notamment plusieurs essais cliniques à son actif exploitant la stratégie des LNP pour la délivrance directe *in vivo*. Ces essais cliniques sont dirigés contre la grippe, le chikungunya, le virus Zika et CMV. Un ARNm vaccinal codant pour l'hémagglutinine du virus de la grippe H10N8 a été injecté en simple dose (100 µg) à 23 individus. Cette immunisation a permis d'induire la sécrétion d'anticorps chez les personnes vaccinées¹⁶⁶. De la même manière, des résultats prometteurs sont obtenus suite à l'injection d'un ARNm codant pour un antigène dirigé contre le virus Zika⁸². D'autres stratégies sont utilisées afin de développer des vaccins efficaces contre la rage (CureVac AG) et contre le VIH-1.

Tableau VI : Principaux essais cliniques réalisés par administration directe des ARNm

(Adapté de Pardi *et al.* 2018²³).

Ce tableau résume les essais cliniques enregistrés sur le site ClinicalTrials.gov. HMPV : Métapneumovirus humain ; ND : non déterminé ; PIV3 : Virus parainfluenza de type 3 humain ; Rép. Réponse ; TAA : antigène associé à la tumeur ; Types d'injection : i.d. : injection intradermique ; i.n. : injection intranodale ; i.m. : injection intramusculaire ; i.v. : injection intraveineuse ; s.c. : injection sous cutanée. En vert les essais cliniques contre des maladies infectieuses.

Compagnies	Type de vaccin (Voie d'administration)	Cibles	Numéro essais clinique (Phase)	Statuts Références	Résultats
BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH	ARNm TAA nu (i.n.)	Mélanome	NCT01684241 (I) NCT02035956 (I)	Terminé ; Résultats ND En cours	
	ARNm TAA dans des liposomes (i.v.)	Mélanome	NCT02410733 (I)	Recrutement ¹⁵⁸	Rep. T spécifique ; IFNα ;
	ARNm TAA formulé dans des liposomes (i.v.)	Cancer du sein	NCT02316457 (I)	Recrutement	
CureVac AG	RNActive et ARNm TAA (i.d.)	Cancer du poumon	NCT00923312 (I/II) NCT01915524 (I)	Terminé ¹⁸⁹ Interrompu ⁵⁴	Vaccin toléré ; Rep. Ac et T chez 50 % des patients
		Cancer de la prostate	NCT02140138 (II) NCT00831467 (I/II)	Interrompu Terminé ¹⁴⁵	Vaccin toléré ; Rép. CD4+ et CD8+ ; Survie
		Rage	NCT01817738 (I/II)	Interrompu ²³¹	
		RNActive et ARNm viral (i.m et i.d.)	NCT02241135 (I)	En cours ¹⁴⁷	
Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica	Trimix et ARNm viral	VIH-1	NCT02413645 (I)	En cours ²³²	Vaccin toléré, Réponse T modérée
Moderna Therapeutics	ARNm viral modifié dans des LNP (i.m.)	Zika	NCT03014089 (I/II)	En cours ⁸²	
		Grippe (H10)	NCT03076385 (I)	En cours ¹⁶⁶	
		Grippe (H7)	NCT03345043 (I)	En cours	
		Chikungunya	NCT03325075 (I)	En cours	
		CMV	NCT03382405 (I)	Recrutement	
Moderna Therapeutics et Merck	ARNm codant un Ag tumoral (i.tumoral)	Cancer	NCT03323398 (I)	Recrutement	
		Tumeur	NCT03313778 (I)	Recrutement	
University Hospital Tübingen	ARNm TAA complexé à la protamine (i.d. et s.c.)	Mélanome	NCT00204607 (I/II)	Terminé ¹⁸⁸	Vaccin toléré ; Rép. T
University of Florida	RNActive et ARNm TAA (i.d.)	Cancer de la prostate	NCT00906243 (I/II)	Interrompu	

3. Fonctionnalisation des vecteurs pour le ciblage des cellules dendritiques

Les vaccins nanoparticulaires miment les particules virales naturelles, et notamment la taille de ces dernières, ce qui permet une meilleure prise en charge par les cellules. Pour améliorer le ciblage des cellules dendritiques (DC), une fonctionnalisation de ces systèmes de délivrance par diverses molécules est possible²³³⁻²³⁵. Certaines molécules exprimées à la surface des CD peuvent être utilisées comme cibles afin de délivrer les antigènes vers ces cellules présentatrices d'antigènes par l'utilisation de ligands ou d'anticorps spécifiques de ces molécules²³⁴.

La capture des antigènes par les DC peut se faire notamment suite à l'implication de divers récepteurs de la famille des lectines de types C (CLR) comme le récepteur au mannose, le DC-SIGN, le DEC-205, la langerine, les dectines-1 et 2, ou encore le CLEC9a²³⁶.

L'ajout de résidus mannoses, des ligands du récepteur au mannose, a été décrit comme particulièrement intéressant dans le cadre de stratégie de ciblage des DC. Leur présence sur des lipoplexes et polyplexes a montré une amélioration au niveau de l'efficacité de transfection de vaccins à ADN²³⁷ et ARNm²³⁸, et l'induction de réponses immunitaires cytotoxiques dans le cas de thérapies anti-cancer ou anti-VIH^{180,239}. De plus, ces récepteurs sont associés à une activation de la voie de cross-présentation²⁴⁰.

Une autre stratégie vise à cibler les récepteurs DC-SIGN et DEC205, exprimés sur les DC, par utilisation de divers ligands ou anticorps. Ces stratégies ont permis d'induire une meilleure prise en charge des particules par les cellules dendritiques immatures²⁴¹⁻²⁴³. Le couplage de l'ovalbumine à un anticorps spécifique de CD205, molécule exprimée de façon spécifique par les DC, permet de délivrer très efficacement cet antigène à ces cellules, ce qui entraîne une forte activation des réponses T^{242,244}. Cette stratégie a été appliquée à l'induction de réponses immunitaires spécifiques d'antigènes du VIH²⁴⁵. De plus, le ciblage de ce récepteur est associé à une cross-présentation des antigènes dans les DC²⁴⁰. Le ciblage par des anticorps dirigés contre la molécule DC-SIGN semble également efficace pour délivrer des antigènes aux DC et permettre l'induction de réponses T²⁴⁶.

D'autres récepteurs peuvent également être impliqués dans le ciblage spécifique des DC, comme les récepteurs *scavenger*, le récepteur Fc ou d'autres récepteurs présents à la surface des DC (CD11c, CD40, etc.)^{234,247}. Par exemple, le ciblage du récepteur CD40 présent sur les DC a montré un intérêt pour l'induction de réponse cytotoxique. L'ajout d'anticorps ciblant le récepteur CD40 à la surface de NP de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) a en effet permis une spécificité au niveau de la prise en charge par les DC et l'induction d'une réponse T CD8⁺²⁴⁸.

3. Les nanoparticules de poly(acide lactique) pour le ciblage des cellules dendritiques

De nombreuses études ont montré un réel avantage du format nanoparticulaire par rapport aux autres vecteurs pour la délivrance d'antigènes, notamment sous forme d'ARNm^{233,249}. Ce format facilite la délivrance aux cellules dendritiques (DC) *in vitro* et *in vivo* avec des capacités de transfection très importantes^{164,192,250}. L'équipe de Phua *et al.* a par exemple montré que la délivrance d'ARNm dans des nanoparticules des 150 nm formées à partir de Stemfect, un agent lipidique commercial (Stemgent), permet de transfecter *in vitro* les cellules DC2.4 et les DC primaires avec une efficacité supérieure à 97 % et 60 % respectivement¹⁶⁴.

Les nanoparticules (NP) permettent de protéger les ARNm des dégradations par les nucléases, mais aussi de faciliter la prise en charge et l'échappement des endosomes¹¹². En effet, les NP miment les particules virales ce qui permet aux cellules de mieux internaliser les ARNm en aidant aux mécanismes d'endocytoses (phénomène de *wrapping* en anglais). Généralement, les particules de grosse taille (> à 0,5 µm) vont être internalisées *via* un mécanisme de phagocytose ou de macropinocytose alors que les particules de petite taille vont être internalisées par les autres voies d'endocytose^{186,251,252}. Suite à leur internalisation dans les endosomes, la présence des charges positives issues du vecteur induit une acidification du compartiment endosomal aboutissant au relargage du matériel antigénique dans le cytoplasme (effet de « l'éponge à proton »). Ceci permet aux ARNm d'être efficacement traduits en protéines antigéniques. Comme vu précédemment, de nombreuses études se sont intéressées aux NP lipidiques et notamment les LNP pour la délivrance des ARNm. En revanche, peu d'études se sont concentrées sur l'utilisation de NP polymériques.

Comme vu précédemment, les systèmes particuliers de délivrance biodégradables à base de polymères synthétiques ou naturels offrent l'opportunité de contrôler la délivrance d'antigènes ou d'adjuvants. Les polymères les plus étudiés dans le contexte de la vaccination sont le poly(acide lactique) (PLA) et le poly(acide-lactique-co-glycolique) (PLGA). Ces polymères sont tous deux approuvés par la FDA pour diverses applications médicales, comme dans les sutures, les prothèses et pour la délivrance thérapeutique. L'intérêt de ces NP polymériques pour la délivrance d'antigènes et d'adjuvants et pour le ciblage des DC a été décrit dans une revue dont j'ai participé à la rédaction (**Annexe I**). Parmi les NP polymériques, le laboratoire du Dr. Bernard Verrier s'est porté sur le polymère de poly(acide lactique) (PLA) pour le développement de nanovecteurs. Le PLA possède d'excellentes propriétés de relargage, d'excellents profils en matière de toxicité et surtout il est homologué par l'US Food and Drug Administration (FDA).

1. Synthèse et caractérisation des particules de PLA

Le poly(acide lactique) ou PLA est un polymère constitué de monomère d'acide lactique, qui peut être obtenu à partir de l'amidon de végétaux tels que le maïs, la betterave ou encore le riz. La fermentation du glucose provenant de ces végétaux conduit à la formation d'acide lactique puis de lactide. Du fait de leur composition, les nanoparticules de PLA (NP-PLA) sont biodégradables par hydrolyse *in vitro* et *in vivo* des fonctions esters en résidus acide lactique et/ou acide glycolique, qui sont intégrés dans le cycle cellulaire de Krebs.

Afin d'obtenir le polymère, une polymérisation par ouverture de cycle des lactides est réalisée en présence d'un catalyseur non toxique : le lactate de Zinc (**Figure 22**). Le polymère utilisé dans cette thèse est un poly(acide lactique) racémique (PLA₅₀).

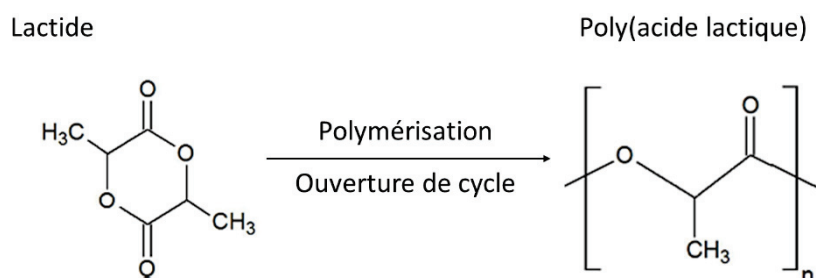


Figure 22 : Synthèse du PLA par polymérisation par ouverture de cycle à partir du lactide.

Les nanoparticules formées à partir de ce polymère ont été synthétisées par la méthode de nanopréciipitation développée par Fessi *et al.*²⁵³. Cette méthode, ne faisant pas intervenir de tensio-actifs, repose sur l'utilisation de deux phases miscibles : une phase organique dans laquelle le PLA est soluble, et une phase aqueuse dans laquelle il précipite. La phase organique est composée d'un solvant efficace du PLA : l'acétone. Le PLA est dissout en acétone à une concentration de 2% w/w sous agitation magnétique puis la solution est placée dans une ampoule à décanter. Une solution aqueuse composée d'un mélange eau / éthanol (avec un rapport généralement fixé à 40% et 60% respectivement) est placée dans un ballon en verre sous agitation magnétique fixée à 250 RPM. Pour réaliser la nanopréciipitation, la phase organique est coulée goutte à goutte dans la phase aqueuse (**Figure 23**). Les solvants (acétone et éthanol) sont ensuite éliminés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 30°C.

La dispersion colloïdale finale dans le ballon est composée de particules de PLA dans l'eau. Les nanoparticules de PLA ont une surface hydrophile leur conférant une stabilité dans les suspensions aqueuses et un cœur hydrophobe. Un des attributs majeurs du PLA est la possibilité d'encapsuler à l'intérieur des NP ou d'adsorber à leur surface un antigène ou une molécule immunostimulante. En effet, il est possible d'encapsuler un principe actif ou fluorophore en ajoutant ce dernier à la phase organique dans laquelle le PLA est dissout ou d'encapsuler le principe actif à la

Etude bibliographique

surface des particules suite à la nanoprécipitation. Ceci nécessite des propriétés physico-chimique adaptées du principe actifs ou fluorophore à vectoriser.

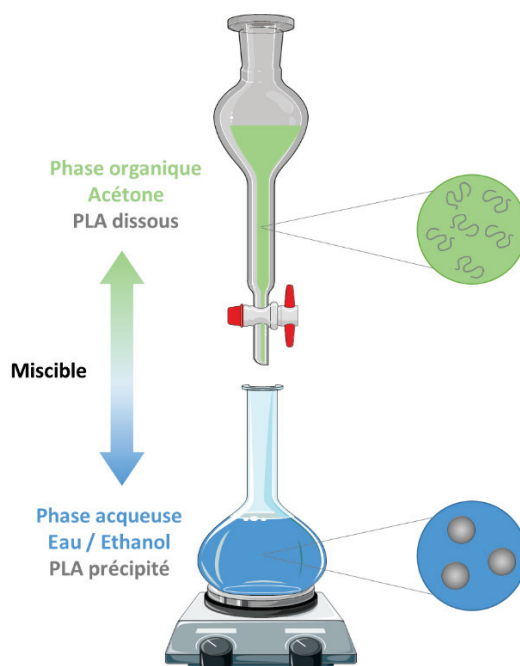


Figure 23 : Procédé de synthèse des nanoparticules de PLA par nanoprécipitation.

Le poly(acide lactique) ou PLA est dissout dans une phase organique composée d'acétone. Cette solution est placée dans une ampoule à décanter et coulée sur une phase aqueuse contenant un mélange eau / acétone. La mise en contact de ces deux phases miscibles entraîne la nanoprécipitation du PLA. Cette synthèse aboutit à la formation de nanoparticules de PLA en une solution aqueuse.

Plusieurs paramètres physico-chimiques sont utilisés pour caractériser les nanoparticules de PLA :

- Le taux de solide correspond à la concentration massique de la solution de particules. Il est calculé par la pesée d'un volume de particules en suspension humide puis séché une nuit dans une étuve à 50°C.

- Le diamètre hydrodynamique moyen et la distribution en taille (indice de polydispersité ou IP) des particules sont déterminés à 25°C par diffusion dynamique de la lumière dans une solution de particules diluées dans 1 mM de NaCl par un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). Cet appareil est équipé d'un laser He/Ne opérant à 633 nm permettant de déterminer le diamètre des particules en suspension. Quatre mesures indépendantes sont réalisées pour obtenir les valeurs moyennes de diamètre hydrodynamique et d'indice de polydispersité. L'IP est une valeur qui s'échelonne de 0 pour les échantillons monodisperses à 1 pour les particules polydisperses. Au sein de l'équipe, nous cherchons à utiliser des particules ayant une valeur d'IP ne dépassant pas les 0,1 ou 0,2 en fonction des molécules formulées.

- La mobilité électrophorétique ou potentiel Zeta permet de renseigner sur la charge de surface des particules. Les valeurs en mV sont déterminées par un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) dans des conditions identiques à celle utilisées pour la détermination de la taille.

2. Avantages des NP-PLA en vaccination et pour le ciblage des DC

La méthode de synthèse du PLA, sans ajout de solvant, leur temps de dégradation long (1 à 2 ans) et leur formulation approuvée par la FDA pour de nombreuses applications font de ce polymère un bon candidat pour le développement de plateforme vaccinale^{254,255}.

Ces particules ont été évaluées dans plusieurs études pour leur capacité à délivrer des antigènes ou molécules immunostimulantes aux DC *in vitro* et *in vivo* afin d'activer des réponses immunitaires (**Annexe I**)¹⁸⁶. La vectorisation d'antigènes par les NP de PLA permet de stimuler efficacement les réponses immunitaires humorales mais également cytotoxiques suite à des administrations chez plusieurs animaux modèles²⁵⁶⁻²⁵⁸. Par exemple, la co-adsorption des antigènes p24 et gp41 du VIH-1 sur les NP-PLA a permis d'induire une forte réponse anticorps chez des souris, supérieure à celle obtenue dans le cas de délivrance avec du MF59, un adjuvant standard²⁵⁹.

De plus, un des avantages majeurs de ce polymère anionique est la capacité d'encapsuler ou d'adsorber divers antigènes avec des molécules immunostimulantes tels que des ligands de TLR²⁶⁰. L'utilisation de ces particules de PLA qui ne possèdent pas d'activité immunostimulante intrinsèque et permettent de vectoriser des antigènes et/ou des molécules immunostimulantes semble être une solution prometteuse afin de stimuler et/ou d'orienter la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène cible. En effet, la co-délivrance d'antigène et de d'adjuvant permet d'augmenter l'immunogénicité et de potentialiser la réponse immunitaire²⁶⁰⁻²⁶². L'encapsulation de ligand de TLR dans ces NP-PLA a permis notamment d'induire des réponses immunitaires au niveau des muqueuses, principales voies d'entrée de certains pathogènes tels que le VIH.

Ces NP-PLA sont en outre efficacement prises en charge par les cellules dendritiques suite à des administrations *in vivo* (**Annexe II**). En effet, suite à des administrations muqueuses de NP-PLA dans des poissons zèbres adultes, ces dernières ont été détectées dans les cellules dendritiques où elle semblent être prises en charge de manière très efficace²⁶³.

Les capacités de vectorisation d'antigènes et de molécules immunostimulantes, de prise en charge par les DC *in vivo* ainsi que d'activation de réponses immunitaires systémiques et muqueuses font des NP-PLA un outil de choix pour la vectorisation d'ARNm. Cependant, la formulation des ARNm par les NP-PLA est une des problématiques majeures de ce système et représente un des défis principal de ce travail de thèse.

III. VACCINATION DANS LE CAS DU VIH-I

1. Le VIH-1

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est un rétrovirus humain responsable de pathologies à évolution lente rassemblées sous le nom de Syndrome de l'Immunodéficience Humaine Acquise ou SIDA.

Le VIH reste actuellement l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), fin 2016, 36,7 millions de personnes vivaient avec le VIH dont 2,1 millions d'enfants âgés de moins de 15 ans. Ce virus touche particulièrement les pays à revenu faible ou intermédiaire, et notamment l'Afrique où 25,6 millions de personnes vivaient avec le VIH en 2016. A ce jour, plus de 35 millions de personnes sont décédées des suites de l'infection par le VIH dont 1 million en 2016 (OMS).

1. Origine

L'origine de cette pandémie semble avoir commencé en Afrique centrale à la fin du 19^{ème} ou au début du 20^{ème} siècle, lors du passage d'un virus du Chimpanzé à l'Homme. Un échantillon de sang prélevé en 1959 au Congo, ainsi que ceux de nombreux patients présentant des maladies rares ont été conservés jusqu'en 1980 et ont révélé les premiers cas documentés de la maladie. Les premiers cas de personnes affectées par le SIDA en occident remontent à 1981 après le recensement aux Etats-Unis d'un groupe d'hommes homosexuels présentant différents symptômes communs (des pneumonies à *Pneumocystis carinii* et un sarcome de Kaposi), liés à un état d'immunodépression important^{264,265}. Des examens approfondis ont alors révélé chez tous les malades un effondrement de l'immunité cellulaire, caractérisé principalement par la quasi disparition des cellules ayant un rôle central dans l'immunité. D'abord associée aux homosexuels puis aux toxicomanes, l'épidémie s'est rapidement répandue en touchant l'ensemble de la population, conduisant à un grand engouement de la part de la communauté scientifique. Le virus responsable de cette épidémie est isolé en 1983 par Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier suite à la réalisation d'observations microscopiques et d'analyses immunologiques^{266,267}.

Au cours des 30 dernières années, de nombreuses connaissances ont été acquises concernant le virus, sa pathogénicité, mais également des approches de traitements et de prévention. Cependant, malgré les efforts, de nombreux défis restent à relever pour développer un traitement curatif et préventif efficace contre ce virus.

2. Organisation génomique et structurale du VIH-1

Le virus du VIH-1 est un rétrovirus humain appartenant à la sous famille des lentivirus (du latin *lenti* pour lent), caractérisée par une période d'incubation longue. Il existe deux souches de VIH : le VIH-1 et le VIH-2, qui présentent des homologies au niveau de leur génome mais qui diffèrent entre elles par leur taux de transmission, leur virulence et les réponses immunitaires qu'ils déclenchent. Le VIH-1, plus virulent, est la cause la plus commune de SIDA dans le monde, alors que les cas d'infection par le VIH-2 sont essentiellement retrouvés en Afrique de l'Ouest²⁶⁴.

Les particules virales du VIH-1 ont une forme sphérique avec un diamètre d'environ 100 nm. Le virus est formé d'une enveloppe virale englobant une capsid qui enferme dans son centre deux copies d'acide ribonucléique (ARN) simple brin. Le génome de cet ARN d'une taille de 9,6 kb est constitué de trois gènes codant pour des protéines de structure (Gag, Pol et Env), de deux gènes codant des protéines régulatrices (Tat et Rev) et de quatre gènes codant des protéines accessoires (Nef, Vif, Vpr et Vpu) (**Figure 24**)²⁶⁸. Ces 9 gènes viraux codent pour 15 protéines.

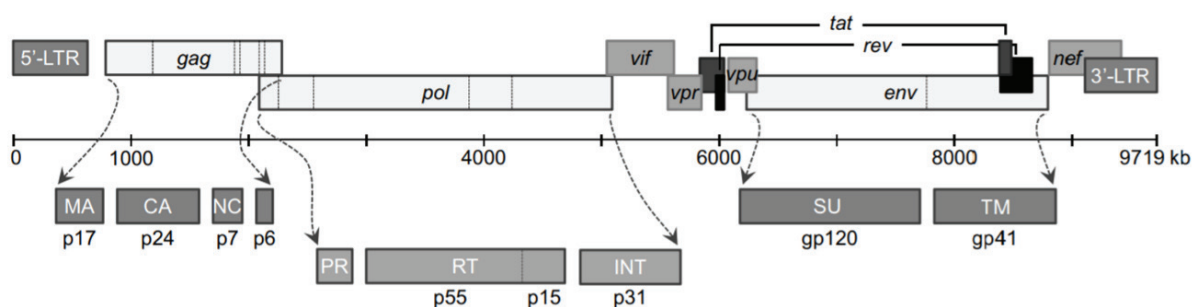


Figure 24 : Organisation du génome du virus VIH-1 (Adapté de de Goede AL *et al.* ²⁶⁸).

Le génome de 9,6 kb se compose de deux LTR et de 9 gènes codants des protéines de structure (Gag, Pol et Env), des protéines régulatrices (Tat et Rev) et des protéines accessoires (Nef, Vif, Vpr et Vpu).

Le gène *env* code pour la protéine précurseur Env de 160 kDa (gp160), qui est ensuite clivée en deux glycoprotéines d'enveloppe : la protéine de surface gp120 et la protéine transmembranaire gp41. L'enveloppe du virus est ainsi formée d'une bicouche lipidique issue de la cellule hôte dans laquelle sont ancrées les protéines gp120 et gp41 (**Figure 25**). Ces deux glycoprotéines sont indispensables à l'entrée du virus dans les cellules cibles. En effet, la gp120 permet l'interaction de la particule virale avec son récepteur CD4 (cluster de différenciation 4) et les co-récepteurs CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) ou CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) des cellules cibles. La gp41 est à l'origine de la fusion entre les membranes virales et cellulaires.

Le gène *gag* code pour la polyprotéine précurseur Gag (*Group-specific antigen*) de 55 KiloDalton (kDa) (p55). Cette polyprotéine génère les protéines p24, p17, p7 et p6 après le clivage par une protéase du VIH. La capsid (CA) est formée de 2000 copies de la protéine p24 qui est liée à la protéine de nucléocapside (NC) p7. La protéine de matrice (MA) p17 est associée à l'enveloppe du

Etude bibliographique

virus. La protéine p6 est importante pour l'incorporation de Vpr dans le virus. Deux peptides de liaison, p2 et p1, sont également libérés.

Le gène *pol* code pour le précurseur protéique Pol (p160) qui comprend trois enzymes responsables de la réplication du virus : la protéase p11, la transcriptase inverse p51/99 et l'intégrase p32. La protéase permet le clivage des précurseurs en protéines fonctionnelles. La transcriptase inverse permet la conversion de l'ARN viral en ADN qui sera intégré dans le génome de l'hôte par l'intégrase²⁶⁸.

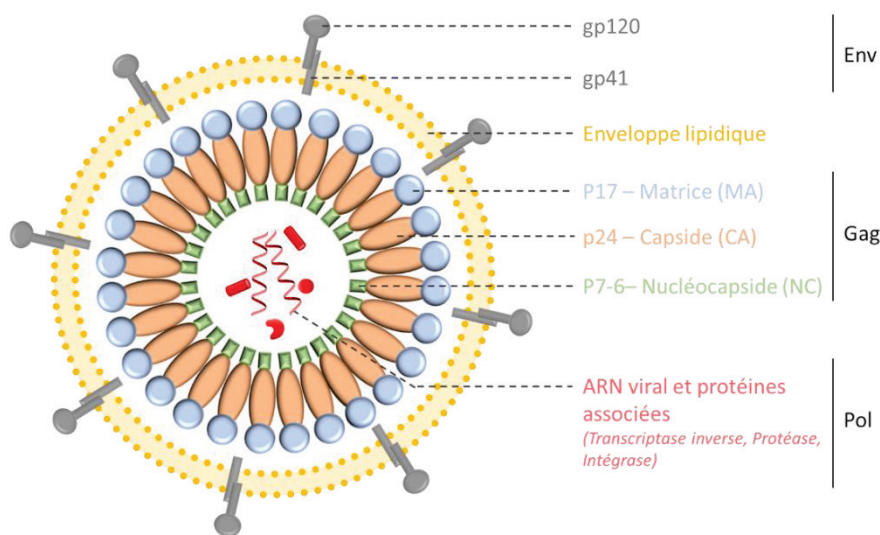


Figure 25 : Structure de virus du VIH-1.

Le VIH-1 est composé d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe (gp120 et gp41) et la protéine de matrice p17. Il contient une capside composée de la protéine de capside p24 liée à la protéine de nucléocapside p6-7 renfermant deux copies d'ARN monocaténaire et d'enzymes nécessaires à la réplication : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse.

Le génome du VIH-1 est également composé de plusieurs gènes impliqués dans la réplication du virus. Le gène *tat* code pour la protéine Tat (trans-activator of Transcription) qui joue un rôle essentiel dans la réplication du virus. Tat va se lier à une région appelée TAR présente dans les ARN transcrits natifs et permettre l'élongation des ARNm. Le gène *rev* code pour la protéine Rev qui permet, *via* son interaction avec le site de liaison RRE (Rev-responsive element), la sortie du noyau des ARNm non épissés codant pour Gag et Pol-Gag. Cette protéine permet ainsi de favoriser la traduction de ces protéines virales. Le gène *nef* code pour la protéine accessoire Nef (negative factor) qui joue un rôle essentiel dans la pathogénicité. En effet, elle bloque l'apoptose cellulaire et réduit l'expression du récepteur CD4 et des molécules du CMH de classe I et II. Le gène *vif* code pour la protéine virale Vif (virion infectivity factor), protéine nécessaire à l'assemblage correct du virus par inhibition de l'activité antivirale de APOBEC3G²⁶⁵. Le gène *vpr* code pour la protéine Vpr qui est associée à la nucléocapside et agit comme médiateur de l'import nucléaire du génome du VIH. Le gène *vpu* code pour la protéine accessoire Vpu (viral protein U) qui est impliquée dans l'échappement de reconnaissance par le système immunitaire en diminuant l'expression des récepteurs CD4⁺ et CMH-I, mais également dans le relargage des nouveaux virions produits par la cellule hôte²⁶⁵.

3. Réplication du virus

Chez une personne infectée par le VIH-1, des particules virales se trouvent dans les fluides physiologiques. Lors d'un contact avec une personne saine, le virus pénètre dans l'organisme *via* les épithéliums muqueux (essentiellement au niveau du tractus gastro-intestinal et des muqueuses génitales) où des cellules de l'immunité sont présentes. Le virus du VIH-1 cible alors les cellules porteuses à leur surface de la molécule CD4+, à savoir les macrophages, les DC mais plus particulièrement les lymphocytes T CD4+. L'infection est initiée lors de la liaison de la protéine d'enveloppe gp120 avec le récepteur CD4+ présent sur ces cellules cibles²⁶⁸. Cette interaction induit un changement de conformation qui permet à la gp120 d'interagir avec le co-récepteur CCR5 et/ou CXCR4, récepteurs de chimiokines présents sur les cellules cibles (**Figure 26**). Cette interaction conduit à son tour à un réarrangement de la protéine gp41, qui va alors s'insérer dans la membrane de la cellule hôte et induire le phénomène de fusion. Cette étape permet l'entrée du virus dans le cytoplasme.

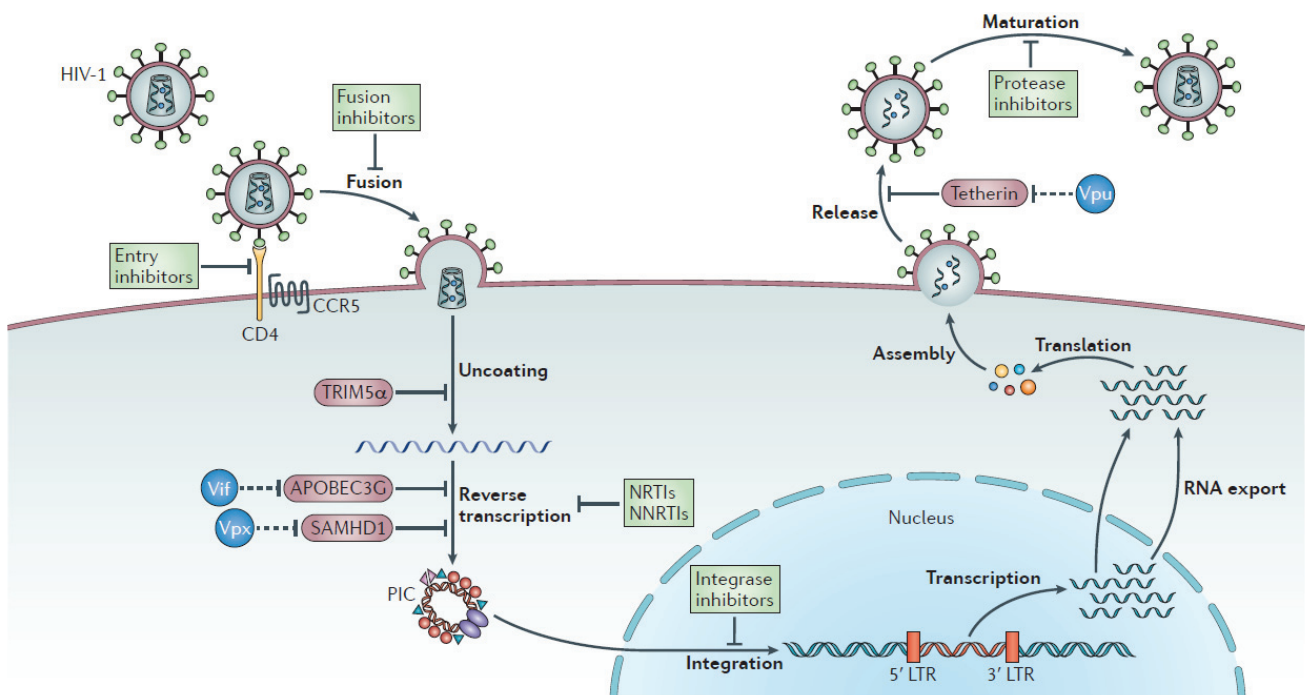


Figure 26 : Cycle de réplication du virus du VIH-1 (Adapté de Barré-Sinoussi *et al.*²⁶⁴).

Le cycle de réplication se divise en plusieurs étapes qui sont : la liaison du virus au récepteur CD4 et au corécepteur, la fusion avec la membrane de la cellule hôte, la décapsidation permettant la libération du génome viral et des protéines dans le cytoplasme, la transcription inverse de l'ARN en ADNc, la formation du complexe de pré-intégration (PIC) et la translocation de ce dernier vers le noyau, l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte et sa transcription en ARN, l'export des ARN viraux dans le cytoplasme et leur traduction en protéines, la migration de ces derniers à la surface de la membrane cellulaire, l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions et la maturation de ces derniers en nouveaux virus. Les familles des principaux antirétroviraux sont présentées en vert.

La décapsidation du virus va ensuite permettre la libération du matériel génétique du virus dans le cytoplasme, permettant la transcription inverse de l'ARN viral en ADN complémentaire

Etude bibliographique

proviral. Cet ADN va ensuite être transporté dans le noyau dans un complexe de pré-intégration (PIC) et être intégré au noyau à l'aide de la protéine Vpr. Une fois dans le noyau, l'ADNc est intégré dans le génome de la cellule hôte par l'intégrase²⁶⁸. Cet ADN proviral va alors être copié au cours des cycles de division des cellules et ainsi être amplifié. La transcription de l'ADNc proviral est ensuite réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire en coopération avec Tat, qui catalyse l'initiation et l'élongation de la transcription. Les transcrits viraux précoces épissés, codant pour les protéines Nef, Tat et Rev, sont exportés dans le cytoplasme²⁶⁸. La protéine Rev, une fois traduite, est transloquée dans le noyau et lie les ARN non épissés (ARNg, ARNm codant pour Gag et Gag/Pol) et mono-épissés (ARN codant pour Env) *via* le site spécifique RRE et favorise leur export vers le cytoplasme^{268,269}. Ces ARN sont alors traduits en protéines de structure. La protéine d'enveloppe gp160 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique par utilisation de la machinerie de traduction de la cellule hôte et adressée à la membrane plasmique par la machinerie de sécrétion cellulaire. Lors de son transit dans l'appareil de Golgi, la gp160 est glycosylée puis clivée pour former des complexes matures gp41/gp120. La protéine Gag est également traduite puis adressée vers les rafts lipidiques (régions de la membrane riches en cholestérol) où se trouvent les glycoprotéines d'enveloppe²⁷⁰. Un bourgeonnement va ensuite avoir lieu au niveau de cette membrane, qui fournit les lipides nécessaires à la formation de la bicouche d'enveloppe du nouveau virus. L'assemblage en particules des monomères de Gag active l'action enzymatique de la protéase qui clive les monomères de Gag et Gag/Pol. Ce réarrangement du nouveau virion va permettre de former le virus mature, capable d'infecter à son tour une nouvelle cellule hôte²⁶⁸.

4. Pathogénicité du VIH-1

Le VIH-1 se transmet au travers de contacts humains rapprochés et notamment par l'intermédiaire de certains liquides physiologiques, selon deux modes de transmission. Le virus peut être véhiculé par transmission horizontale à travers un contact sexuel ou un contact sang-sang (transfusion ou seringues contaminées), ou verticale, de la mère à l'enfant lors de la grossesse et/ou de l'accouchement²⁶⁸. Cependant, la grande majorité des transmissions du virus se fait par voie sexuelle, ce qui fait de ce virus une des maladie sexuellement transmissible majeure. Le risque de transmission est présent dès les premiers stades de l'infection et persiste toute la vie. Cependant ce risque de transmission peut être limité si la charge virale est contrôlée ; cette stratégie est à la base des traitements actuels basé sur l'utilisation de thérapies antirétrovirales²⁶⁴.

Au niveau clinique, l'infection par le VIH-1 peut se répartir en trois phases : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique et la phase SIDA²⁶⁸.

Etude bibliographique

La phase de primo-infection correspond aux premières semaines après l'entrée du virus dans l'organisme. Au cours de cette phase, le virus va entrer dans l'organisme et se propager rapidement au niveau des ganglions lymphatiques locaux par l'intermédiaire du système sanguin. La dissémination du virus se fait alors dans tous les organes lymphoïdes et notamment dans le GALT (tissu lymphoïde associé au tube digestif), où se trouve un important nombre de LT-CD4⁺ porteurs du co-recepteur CCR5²⁷¹. En contact de ces cellules cibles, le virus va se répliquer rapidement en induisant une augmentation de la charge virale détectable au niveau sanguin. Cette augmentation de la charge virale va s'accompagner d'une diminution brutale de la population de LT CD4⁺, essentielle au fonctionnement correct du système immunitaire. L'organisme va alors s'affaiblir et des symptômes de type maux de tête, fièvre, fatigue ou perte de poids vont apparaître. Au bout de 6 semaines, le système immunitaire va produire des anticorps qui vont permettre la chute de la charge virale²⁷¹.

S'ensuit alors la phase asymptomatique qui peut durer de nombreuses années. Au cours de cette deuxième phase, le système immunitaire arrive à contenir l'infection en maintenant la charge virale à un niveau stable. Un réservoir latent de cellules infectées dans les organes lymphoïdes est alors présent chez les personnes infectées. Cette phase de latence asymptomatique peut durer en moyenne 10 ans. Cependant, la présence d'antigènes ou de cytokines va induire une réactivation de ces cellules et la production de nouveaux virus²⁷². Peu à peu, le virus va prendre le dessus, conduisant à une virémie croissante et à une nouvelle chute de la quantité de LT-DC4⁺. En absence de traitement, cette immunodépression graduelle peut aboutir à la dernière phase de l'infection par le VIH : le Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquisée ou SIDA.

La phase SIDA est reconnue cliniquement lorsque la quantité de LT-CD4⁺ atteint les 200 copies / mL de sang²⁶⁸. Le système immunitaire va alors s'écrouler et induire une immunodépression acquise. Cette phase va s'accompagner de l'apparition de nombreuses maladies opportunistes telles que des tumeurs (Sarcome de Kaposi et leucémies notamment), des infections bactériennes ou virales (tuberculose, herpes ou infection au cytomégalovirus) ou encore des infections parasitaires et fongiques. Parmi ces maladies, la tuberculose représente la principale cause de mortalité des patients atteints par le SIDA²⁶⁸.

La progression de la maladie est variable en fonction des individus. La majorité des personnes infectées par le virus vont développer la phase SIDA dans les 10 ans après la primo-infection. D'autres groupes de personnes ont la capacité de développer les symptômes plus tardivement, ou de rester séronégative au VIH-1 malgré une forte exposition au virus. L'étude de ces groupes de personnes a permis de déterminer de potentiels corrélats de protection vis-à-vis du VIH-1.

2. Développement de thérapies contre le VIH-1

1. Les thérapies antirétrovirales

Les traitements antirétroviraux permettent de rendre la charge virale indétectable, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la quantité de cellules CD4+ ainsi que d'une diminution de la morbidité chez les personnes infectées et du risque de transmission du virus à un tiers. Cependant, le réservoir du virus n'est pas éliminé par ces traitements, ce qui oblige de poursuivre les traitements à vie pour contrôler durablement l'infection.

Pour le développement de traitements antiviraux, le cycle viral du VIH-1 doit être interrompu sans pour autant tuer la cellule hôte. Pour éviter les dommages cellulaires, ils doivent ainsi être spécifiques au pathogène en ciblant les molécules propres à ce dernier (cf **Figure 26**)²⁷³. Ainsi, le premier médicament anti-VIH-1 visait la rétro-transcriptase, une enzyme impliquée dans la transcription inverse (processus absent des cellules eucaryotes). Les inhibiteurs de transcriptases virales sont séparés en deux classes : les INTI (inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse ou NRTI en anglais) et les INNTI (pour inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse ou NNRTI). Les INTI sont des inhibiteurs compétitifs qui se fixent au niveau du site actif de l'enzyme et sont reconnus comme des nucléotides. Ils sont ainsi incorporés dans l'ADN et induisent un arrêt de la réplication du virus. L'AZT ou azidothymidine (Zidovudine®), premier traitement antirétroviral, et l'Abacavir (Ziagen®) font partis de cette famille²⁶⁴. Les INNTI sont des inhibiteurs non compétitifs de la transcriptase virale ; ils se distinguent par leur mécanisme qui ne cible pas le site actif de l'enzyme.

Par la suite, sont apparus les inhibiteurs de la protéase virale, enzyme impliquée dans la maturation du provirus. Ces molécules, telles que : le Rintovir (Norvir®) ou l'Amprénarvir (Prozei®), miment un peptide de liaison au niveau du site actif de la protéase.

Pour ces deux classes d'inhibiteurs, il a rapidement été constaté une pression de sélection avec l'émergence de virus résistants à ces molécules antivirales. Depuis l'introduction de l'AZT en 1987 et l'échec de ces monothérapies, de nombreux progrès ont été réalisés dans la thérapie antirétrovirale et notamment avec l'utilisation de la thérapie combinée^{264,273}. Le développement de thérapies combinées a débuté dès les années 1990 avec l'apparition du Combivir®, un combinaison de Lamivudine® et de zidovudine®, deux INTI²⁷³. Les trithérapies actuelles sont composées de deux INTI et d'un INNTI ou un inhibiteur de protéase²⁶⁴.

Plus récemment, de nouvelles classes d'antirétroviraux sont apparues. Le Maraviraoc (Celsentri®) est une petite molécule bloquant l'interaction entre le corécepteur de chimiokine CCR5

Etude bibliographique

et la protéine virale gp120. Ceci permet d'inhiber l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Le T20 (Fuezon®) bloque les changements conformationnels de la protéine gp41 nécessaires à la réalisation de l'étape de fusion entre le virus et la cellule cible. Enfin, des anti-intégrases, enzymes nécessaires à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte, ont vu le jour avec notamment l'Insectress (Raltégravir®)²⁷³.

Tous ces traitements ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients infectés par le VIH-1. Cependant, comme évoqué précédemment, ils ne permettent pas l'éradication du virus qui reste présent dans un réservoir latent²⁶⁴. De plus, ces traitements sont à l'origine de nombreux effets secondaires indésirables, résistances, et enfin, ces traitements sont très onéreux²⁷⁴. Au cours de l'année 2017, seulement 54 % des personnes porteuses du VIH ont bénéficié d'un traitement antirétroviral (OMS). Toutes ces considérations encouragent le développement de nouvelles thérapies anti-VIH, et notamment la mise en place d'un vaccin prophylactique ou curatif.

2. Analyses des corrélats de protection pour le développement de vaccins prophylactiques et thérapeutiques

Dans la perspective de développer un vaccin efficace contre le VIH, de nombreuses recherches s'intéressent à des groupes d'individus capables d'éviter l'infection par le virus ou contrôlant leur charge virale sans l'aide de thérapies anti-rétrovirales.

- Le premier regroupe sous le terme d'ENI (Exposés Non Infectés) des personnes demeurant séronégatives malgré des expositions répétées au virus. L'existence d'ENI a été décrite pour la première fois dans les années 1990 lorsqu'une étude a montré que 14 % des prostituées à Nairobi au Kenya sont restées séronégatives malgré trois ans de pratiques à risque²⁷⁵.
- Les seconds sont regroupés sous les termes de LTS (*Long Term Survivors*), LTNP (*Long Term Non-Progressors*) et EC (*Elite Controllers*). Ces groupes sont capables de contrôler leur charge virale sans traitements par trithérapie²⁷⁶.

La caractérisation de marqueurs biologiques corrélant avec le contrôle de la maladie chez ces sujets pourrait permettre la conception de vaccins prophylactiques ou thérapeutiques efficaces.

Corrélats immunitaires

Plusieurs groupes ont mis en évidence des réponses immunitaires adaptatives cellulaires ou humorales contre le VIH-1 chez des ENI, mais également la présence des IgA neutralisantes dans les muqueuses. Du fait de leur présence au niveau des muqueuses, les IgA représentent la première ligne de défense immunitaire contre un grand nombre d'infections virales. Des titres élevés d'anticorps neutralisants dans les muqueuses sont probablement essentiels pour prévenir une infection par le VIH

Etude bibliographique

et ils ont été détectés dans les muqueuses de certains individus ENI²⁷⁷⁻²⁷⁹. Il a également été démontré que la présence d'IgA spécifiques de la gp41 et d'IgG avec des activités neutralisantes ou de phagocytose et neutralisation médiée par le récepteur Fc (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Ac ou ADCC) au niveau vaginal était un signe de protection chez des macaques après challenge vaginal²⁸⁰. De plus, certains individus infectés par le VIH développent des réponses anticorps à large spectre plusieurs années après infection, permettant de neutraliser des régions conservées de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1²⁸¹.

Une fois l'infection mise en place dans l'organisme, les anticorps neutralisants semblent être incapables de contrôler la propagation du virus. Pour éliminer les cellules infectées, une forte réponse des LT CD8⁺ semble primordiale. En effet, la plupart des individus infectés développent de fortes réponses cytotoxiques en réaction au premier pic de virémie, résultant en une baisse de la charge virale lors de l'infection précoce. Cependant, dans la plupart des cas (excepté pour les EC), ces réponses ne sont pas capables de maintenir un contrôle complet de la virémie, principalement dû à un échappement immunitaire²⁸² ou à une activation immunitaire chronique²⁸³, ce qui aboutit à un épuisement en LT²⁸⁴. Au contraire, chez les EC, les LT CD8⁺ conservent leur fonction et de nouvelles réponses cytotoxiques efficaces émergent contre les variants viraux²⁸⁵. De plus, une forte affinité des récepteurs des LT pour les complexes CMH-I/peptide induit la présence de LT CD8⁺ polyfonctionnels lysant les cellules cibles plus rapidement²⁸⁶. Ces LT CD8⁺ polyfonctionnels présentant différentes fonctions effectrices comme la production d'IFN γ , de TNF α , d'IL-2, de MIP-1 β et de perforines et/ou granzymes) et une capacité à proliférer après exposition à un antigène ont été observés chez des EC²⁸⁷. Une étude a rapporté que les réponses dirigées contre les épitopes Gag sont dominantes et potentiellement protectrices chez les LTNP et les EC²⁸⁸.

La maturation et la différenciation des LT CD8⁺ en cellules mémoires et effectrices sont dépendantes des LT CD4⁺. Cependant, les LT CD4⁺ restant après le stade aigu de l'infection ont besoin de produire de l'IFN γ et de l'IL-2 afin de proliférer et d'aider à l'activation des LT CD8⁺. Cette fonction T_H1 est réduite chez les non-controllés²⁸⁹.

Résistance naturelle et facteurs génétiques

Des études ont mis en évidence plusieurs facteurs génétiques qui peuvent induire une protection ou une meilleure gestion du virus. En effet, les individus portant une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour le co-récepteur CCR5 présentent une résistance à l'infection par le VIH-1²⁹⁰. Les personnes hétérozygotes (5 à 15 % des individus européens) et surtout les personnes homozygotes sont relativement protégées de l'infection par le virus²⁹¹. Il a été montré que la

Etude bibliographique

transplantation de cellules souches *CCR5* $\Delta 32/\Delta 32$ permettait le contrôle de la charge virale chez un patient atteint du VIH, même après l'interruption de son traitement antirétroviral²⁹².

Certaines molécules intracellulaires exprimées par l'hôte peuvent également protéger partiellement contre l'infection cellulaire ou le relargage du virus. Les facteurs protecteurs majeurs identifiés aujourd'hui sont APOBEC3G (et APOBEC3F), TRIM5 α et la tétherine. APOBEC3G est une cytotokine déaminase qui incorpore une adénosine à la place d'une guanosine durant la synthèse de l'ADN viral, conduisant en un ADN proviral défectueux²⁹³. De plus, APOBEC3G induit une cytotoxicité médiée par les cellules NK (*natural killers*) qui peuvent ainsi lyser efficacement les cellules infectées par le VIH pour lesquelles l'expression du CMH-I est inhibée par le virus²⁹⁴. Les individus exprimant fortement APOBEC3G présentent une charge virale plus faible lors de la phase aiguë de l'infection²⁹⁵. TRIM5 α se fixe à la capsid virale, bloquant la réplication précoce²⁹⁶. La tétherine interfère avec le relargage des virions aidant à l'attachement des virions les uns aux autres et à la membrane de la cellule hôte²⁹⁷.

Certains polymorphismes des molécules du HLA (*Human Leucocyte Antigen*) ainsi que les récepteurs des LT et/ou NK peuvent affecter la réponse cellulaire anti-VIH. Il a été démontré dans différentes cohortes que les molécules HLA B*27, B*57 et B*58 sont associées à un meilleur contrôle du VIH-1 et à une progression plus lente de la maladie^{285,298}. La molécule HLA B*57 joue aussi un rôle dans la réponse immune innée protectrice, agissant comme un ligand naturel inhibant les KIR (*Killer Ig-like Receptors*). Une activité accrue de ces cellules NK et l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs KIR3DS1 et KIR3DL1 ont été associées à un risque réduit d'infection dans une cohorte de consommateurs de drogues par injection intraveineuse^{299,300}.

L'ensemble de ces corrélats de protection (**Tableau V**) doit être pris en compte dans la conception de vaccins anti-VIH. Cependant, aucun de ces facteurs ne peut réellement prédire une protection contre une infection au VIH.

Tableau V : Corrélats de protection contre le VIH-1.

Niveau de protection	Corrélat de protection	Ref
Facteurs génétiques	<i>CCR5</i> $\Delta 32/\Delta 32$	290
	Facteur antiviral APOBEC3G	294,295
	Production de TRIM5 α	296
Facteurs de restriction	Augmentation de la tétherine	297
	HLA B*27, B*57, B*58	285,298
	KIR3DL1, KIR3DS1	299,300
Réponse humorale	Anticorps neutralisants : IgA au niveau des surfaces muqueuses	277-279
	Anticorps neutralisants à large spectre	281
Réponse cellulaire	LT polyfonctionnels	286
	Prolifération des LT CD4+ et CD8+	287
	Avidité des réponses T spécifiques du VIH	289

3. Stratégies de vaccination contre le VIH-1

Malgré plus de trente ans de recherche à travers le monde et des moyens considérables mis en œuvre pour le déploiement de thérapies contre le VIH-1, la conception d'un vaccin anti-VIH-1 reste toujours un défi majeur de santé publique (**Figure 27**). La grande variabilité du virus est souvent décrite comme la cause majeure des difficultés dans le développement d'un vaccin efficace mais de nombreux autres facteurs entrent en jeu. En effet, la nature du virus, son intégration dans le génome de l'hôte, son tropisme pour les cellules de l'immunité ainsi que sa capacité à échapper à la réponse immunitaire représentent également des obstacles dans le développement d'un vaccin anti-VIH-1³⁰¹.

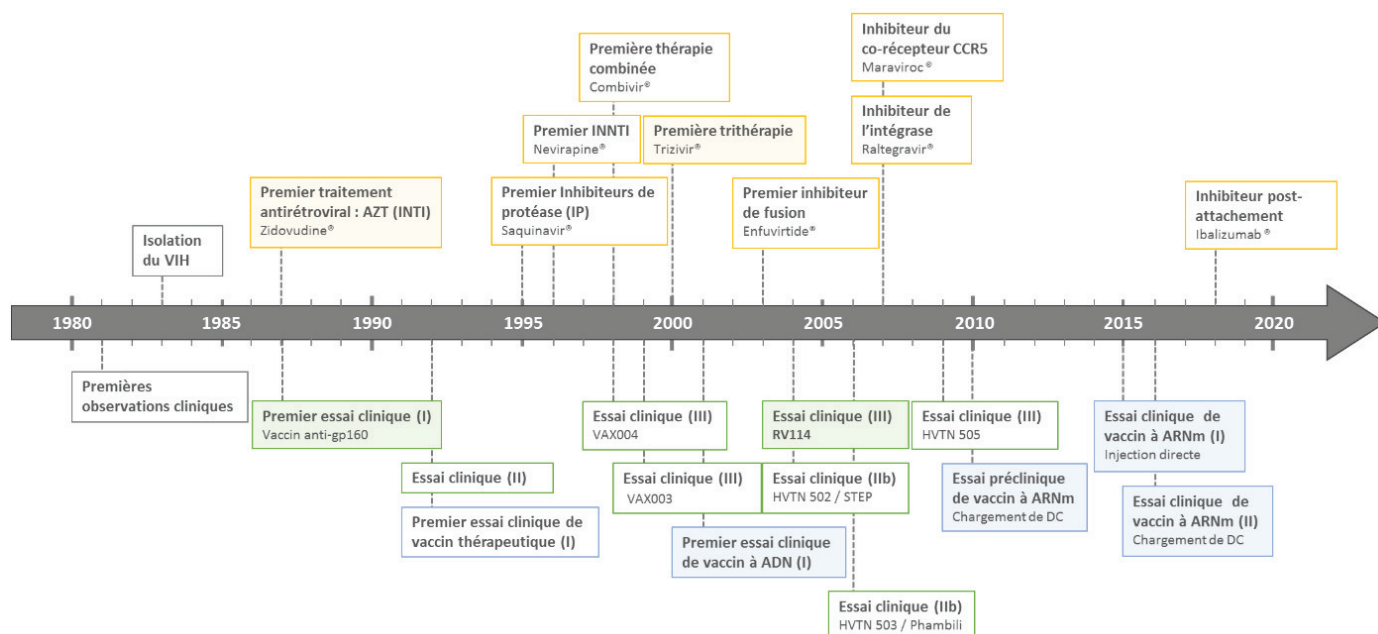


Figure 27 : Principales avancées thérapeutiques contre le VIH-1.

En jaune sont représentées les principales avancées en terme de thérapies antirétrovirales anti-VIH-1 depuis la découverte du virus. Les essais cliniques majeurs réalisés dans le cadre de vaccins prophylactiques (en vert) ou thérapeutiques (en bleu) anti-VIH-1 sont identifiés. Les phases des essais cliniques sont inscrites entre parenthèses. AZT : azidothymidine ; CCR5 : CC-chemokine receptor 5 ; INTI: inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse ; INNTI : inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse ; VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

a. Développement de vaccins prophylactiques

Depuis le premier essai clinique en 1987 d'un vaccin basé sur l'utilisation d'une gp160 recombinante, plus de 150 candidats vaccins ont été testés. L'ensemble des études réalisées ont abouti à la réalisation de seulement six essais cliniques de phase IIb ou III, dont un seul n'a pas échoué (**Tableau VI**)³⁰². L'essai RV144, réalisé en Thaïlande, repose sur une première administration, ou *prime*, d'un vecteur viral exprimant trois gènes du VIH, *env*, *gag* et *pro* (ALVAC), suivi d'une deuxième administration, ou *boost* avec la glycoprotéine d'enveloppe du VIH gp120 (AIDSVAX). Cet essai a conduit à des résultats limités, avec seulement 31,2% d'efficacité à 42 mois³⁰³. Cependant, bien que ce vaccin ait montré des effets bénéfiques à court terme, son efficacité n'est pas suffisante pour être déployée à grande échelle.

Tableau VI : Efficacité des principaux essais cliniques terminés dans le cadre de vaccins anti-VIH

(Adapté de Stephenson *et al.* 2016³⁰⁴).

Les phases des essais cliniques sont indiquées entre parenthèses. HVTN: HIV Vaccine Trials Network; ADCVI: antibody-dependent cell-mediated virus inhibition; ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity.

Nom de l'essai	Type de vaccin	Résultats observés	Efficacité
VAX004 (III)	AIDSVAX B/B gp120 en alum	Anticorps non neutralisants, ADCVI	Aucune
VAX003 (III)	AIDSVAX B/E gp120 en alum	Anticorps non neutralisants	Aucune
HVTN 502 / STEP (IIb)	Adénovirus type 5 Clade B gag/pol/nef	Réponses CD4 ⁺ et CD8 ⁺ spécifiques du VIH-1	Aucune, risque d'infection augmenté
HVTN 503 / Phambili (IIb)	Adénovirus type 5 Clade B gag/pol/nef	Réponses CD4 ⁺ et CD8 ⁺ spécifiques du VIH-1	Aucune, risque d'infection augmenté
RV144 (III)	ALVAC-HIV (vecteur recombinant Canarypox)/vCP1521 et AIDSVAX B/E rgp120 en alum	Réponses immunitaires humorales et cellulaires, anticorps non neutralisants à V1V2, ADCC élevée, IgG3 anti-VIH-1, récepteur FcγRIIC	31,2% d'efficacité à 42 mois, 60% d'efficacité à 12 mois.
HVTN 505 (II)	ADN Gag, Pol, et Nef du sous-type B et Env des sous-types A, B, et C du HIV-1 et rAd5 sous-type B Gag-Pol et Env A, B, and C	Réponse T au VIH-1, réponse CD4 ⁺ anti Gag	Aucune

Bien que ces essais n'aient pas démontré d'efficacité suffisante pour espérer être commercialisés, plusieurs informations ont été apportées pour le développement de nouveaux vaccins^{301,305}. Les récents succès sur l'isolation d'anticorps neutralisants à large spectre (*bnAbs*), la découverte des mécanismes d'induction de ces anticorps ainsi que la découverte de mécanismes des LT CD8⁺ permettant la destruction de cellules infectées par le VIH ont notamment ouvert la recherche à de nouvelles opportunités pour le design de vaccins.

Nécessité d'induire des anticorps polyfonctionnels

Suite aux résultats prometteurs de l'essai RV144, de nouveaux tests ont été effectués pour améliorer l'efficacité de RV144 en utilisant d'autres adjuvants et la protéine Env^{304,305}. D'après les observations effectuées, une des premières approches pour le développement de vaccin efficace contre le VIH-1 consiste à induire des anticorps non-neutralisants ayant une fonction protectrice en évitant la transmission du VIH *in vivo*. Pour cela, l'induction d'anticorps non-neutralisants spécifiques de la région V2, des boucles V1V2 de la protéine Env ou polyfonctionnelle semble une propriété souhaitée dans les stratégies vaccinales anti-VIH à venir³⁰⁴. En effet, il a été démontré que la génération d'anticorps non neutralisants spécifiques des boucles V2 de Env et qu'un haut niveau de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC) médiée par ces anticorps sont associés à un risque réduit d'acquisition du VIH-1^{304,306,307}. De plus, il a été démontré que la génération

Etude bibliographique

d'anticorps polyfonctionnels spécifiques de Env était associée avec un risque réduit d'acquisition du VIS (Virus de l'immunodéficience Simienne) après des challenges rectaux répétés chez le primate³⁰⁸.

Induction d'anticorps neutralisants large-spectre

Une des stratégies les plus étudiées ces dernières années tourne autour de l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre (*bNAbs*), capables de neutraliser une large diversité d'isolats du VIH-1^{304,309}. Ces anticorps sont retrouvés chez 10 à 30 % des patients infectés et se développent plusieurs années après l'infection. La cible unique de ces anticorps est la glycoprotéine d'enveloppe Env du VIH-1. Plusieurs études ont montré des résultats encourageants chez les primates non-humains. Cependant, les vaccins actuels ne sont pas capables d'induire des quantités suffisantes d'anticorps. Pour pallier à ce problème, de nombreuses stratégies sont développées pour induire des *bNAbs* suite à des administrations³⁰⁴. Une de ces approches consiste à développer des immunogènes qui miment au plus près les épitopes des anticorps neutralisants à large spectre comme par exemple des protéines Env trimériques BG505 SOSIP.664, stabilisées par des ponts disulfure³¹⁰.

Induction de réponses effectrices

Le groupe de Picker *et al.* a notamment montré que la vaccination de macaques avec le gène codant pour la protéine Gag du VIS inséré dans un vecteur cytomégalovirus atténué a permis d'éliminer les cellules infectées par le SIV dans environ 50% des singes vaccinés³¹¹. Dans cette étude, le vecteur utilisé a induit une réponse CTL de grande ampleur, et l'élimination des cellules infectées s'est faite à travers une reconnaissance de l'antigène. Des études sont en cours pour déterminer si des réponses similaires pourraient être induites chez l'Homme.

De plus, l'induction de réponses immunitaires au niveau des muqueuses, porte d'entrée principale du virus, semble également être une stratégie intéressante pour le développement de vaccins³⁰⁴. En effet, l'induction de fortes réponses cellulaires muqueuses semble limiter la production du VIH-1 dans ces dernières. Des titres élevés d'IgA neutralisantes ont été détectés aux surfaces muqueuses d'individus ENI²⁸⁰. L'induction de titres élevés d'IgA au niveau des muqueuses pourrait donc permettre une protection des individus contre le VIH-1.

Induction de réponse à large spectre

L'essai RV144, seul essai clinique ayant montré une efficacité, a induit une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire. Ce type de réponse à large spectre semble donc être au centre de l'efficacité des vaccins anti-VIH-1. Les traitements actuels se tournent ainsi vers le développement de thérapies combinant l'induction de réponses humorale et cellulaire. L'équipe de

Etude bibliographique

D. Barouch *et al.* a récemment publié les résultats d'un essai clinique réalisé avec un vaccin prophylactique³⁰⁸. L'injection en *prime - boost* d'antigène du VIH-1 a permis d'induire une réponse anticorps spécifique chez 100 % des individus, l'induction d'ADCC chez 80 % des personnes et une réponse T chez 83 % des patients. Les auteurs suggèrent que la protection face à l'infection est médiée principalement par des anticorps spécifiques de Env alors que le contrôle de la charge virale est permise par une réponse cellulaire anti-gag³¹². Ce type de vaccin est en cours d'évaluation dans le cadre d'un essai clinique de phase IIb en Afrique.

b. Développement de vaccins thérapeutiques anti VIH-1

Au vu de la difficulté à induire des anticorps neutralisants à large spectre, l'effort s'est porté sur le développement de thérapies permettant une rémission, avec notamment l'utilisation de vaccins thérapeutiques. L'objectif majeur de ce type de vaccin est de stimuler l'immunité cellulaire anti-VIH-1 et d'induire une réponse des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) CD8+ permettant le contrôle de la virémie. En effet, les LTC peuvent contrôler la charge virale du VIH-1 en tuant les cellules CD4⁺ infectées par le virus, ce qui peut être nécessaire pour éliminer le réservoir latent du VIH-1^{272,274,313,314}. Dans un modèle simien, l'induction d'une réponse LTC a notamment démontré son efficacité pour protéger les animaux contre le virus³⁰⁴. Dans un premier temps, les vaccins thérapeutiques ont été développés comme alternative aux thérapies antirétrovirales dans le but de contrôler la virémie en cas d'absence ou d'interruption de traitements, ainsi que de limiter le coût et la toxicité de ces traitements³¹⁵. Cependant ce type de thérapies n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants³¹⁵. Ces dernières années, une nouvelle approche appelée « *shock and kill* » utilisant les vaccins thérapeutiques en combinaison avec les traitements antirétroviraux a été développée. Cette stratégie repose sur l'administration de vaccins thérapeutiques en combinaison avec des agents qui réactivent la production du virus dans les cellules latentes. Ces dernières vont être détectée par les LTC induites par les vaccins, conduisant à l'élimination totale du réservoir du virus. Cette stratégie a notamment montré l'éradication du virus chez un patient³¹⁵. Pour induire ce type de réponse, diverses stratégies ont été développées.

Initialement, le développement de vaccin thérapeutique s'est basé sur l'utilisation d'approches classiques, telles que l'utilisation de virus atténués ou encore de protéines recombinantes telles que la gp120, puis sur des peptides et des ADN codants des antigènes du VIH-1 et de vecteurs viraux³¹⁶. Cependant, l'efficacité de ce type de vaccination thérapeutique s'est révélée limitée²⁷⁴. De plus, il a été montré que la combinaison de vaccins thérapeutiques aux traitements antirétroviraux actuels pouvait permettre d'éliminer le réservoir latent du virus tout en inhibant sa réplication. Ces stratégies sont actuellement testées en essais cliniques.

Etude bibliographique

De nouvelles approches sont également développées ces dernières années afin d'activer les réponses cytotoxiques *via* l'activation des cellules dendritiques. Les vaccins basés sur l'utilisation de DC activées *ex vivo* a été très étudiée ces dernières années dans le cadre du développement de vaccins anti-VIH-1, et ont donné des résultats prometteurs. Il a été montré que l'activation *ex vivo* de DC de macaques par un ARNm codant pour la protéine Gag du VIH-1 puis leur réinjection chez l'animal permettait d'induire une réponse T spécifique et efficace³¹⁷. Chez l'Homme, l'électroporation d'ARNm codant pour les protéines Gag et Env du VIH-1 dans des DC humaines ont permis d'activer des LT issus de patients atteint par le VIH-1 *in vitro*³¹⁸. Cependant, l'utilisation de cette stratégie chez des patients infectés a permis la production de LT CD4+ et LT CD8+ mais sans aucun bénéfice clinique²⁰³⁻²⁰⁸. De plus, bien que ces vaccins aient montré un bon profil de sureté avec des effets secondaires mineurs (type symptômes grippaux)^{204,206}, cette stratégie de vaccination thérapeutique est difficile à mettre en place à grand échelle.

L'injection directe d'ARNm *in vivo* pour le ciblage des DC est devenue une stratégie alternative prometteuse. Le groupe de M. Plana et P. Garcia a notamment montré récemment que l'injection directe en intranodale d'un ARNm nu codant pour le signal d'activation Trimix et un antigène du VIH-1 (fragments de séquences issus de Gag, Pol, Vif et Nef) donnait des résultats prometteurs lors de tests précliniques⁵¹.

Comme décrit dans la première partie, l'utilisation d'ARNm dans les formulations vaccinales présente de nombreux avantages^{23,118}. Des résultats encourageants ont notamment été obtenus dans le cas de vaccins contre la grippe ou dans le domaine de la cancérologie aboutissant à la réalisation d'essais cliniques que ce soit suite au chargement des DC *ex vivo* ou à l'injection directe *in vivo* (cf **Tableau III et IV**). Le développement de stratégies permettant la délivrance directe d'ARNm *in vivo* aux DC représente ainsi une stratégie très prometteuse dans le développement de vaccins anti-VIH que ce soit prophylactique ou thérapeutique.

IV. PROJET D'ETUDE

Les thérapies basées sur des combinaisons d'antirétroviraux sont de précieux outils dans la lutte contre le VIH. Cependant, ces approches ne permettent pas d'éradiquer le virus chez les patients infectés et restent limitées par l'émergence de résistances, la présence d'effets secondaires et leur coût élevé. Actuellement, pour permettre au système immunitaire de contrôler l'infection, des vaccins thérapeutiques sont développés, notamment pour permettre l'activation des lymphocytes T-CD8+ cytotoxiques. Les LT-CD8+ vont permettre la lyse des cellules infectées par le virus et ainsi le contrôle de la réplication virale.

Les cellules dendritiques (DC), principales cellules présentatrices de l'antigène, permettent d'activer la réponse immunitaire, que ce soit humorale mais également cytotoxique, par l'intermédiaire LT-CD8+. L'administration de DC autologues activées par des antigènes du VIH-1 *ex vivo* chez des patients infectés a donné des résultats prometteurs²⁰³⁻²⁰⁸. Mais ce type de vaccination, techniquement délicate et personnalisée, est difficile à appliquer à grande échelle.

Les vaccins à ARNm constituent une piste prometteuse pour l'activation des cellules dendritiques *in vivo*²³. Contrairement aux ADN vaccinaux qui doivent atteindre le noyau des cellules pour s'exprimer, les ARNm sont directement fonctionnels dans le cytoplasme. Ceci leur confère le potentiel d'agir sur les cellules en repos ou à faible capacité de division, telles que les DC. Dans ces cellules, un ARNm vaccinal présent dans le cytosol est traduit en protéine antigénique et présenté par le CMH-I ou le CMH-II. Ceci permet d'induire non seulement une réponse humorale comme dans les vaccins classiques, mais aussi une réponse cytotoxique. Cependant, un défi majeur de ce type de vaccins consiste à vectoriser les ARNm vaccinaux pour permettre leur délivrance au cytoplasme des cellules dendritiques et leur protection vis à vis des RNases pendant leur transport. Pour cela, la vectorisation des ARNm dans des nanoparticules offre des perspectives intéressantes²³.

L'équipe du Dr Bernard Verrier développe des systèmes de vectorisation basés sur des nanoparticules de poly (acide lactique) (PLA), un polymère biocompatible et entièrement métabolisable. Ces nanoparticules (NP) peuvent vectoriser aussi bien des composants hydrophobes, qui sont encapsulés à l'intérieur des NP, que des molécules hydrophiles, qui sont adsorbées par des liaisons faibles à leur surface^{186,260,319}. Ces NP sont efficacement prises en charge par des cellules présentatrices d'antigènes, non seulement en culture *in vitro*, mais aussi après administration muqueuse *in vivo*^{256,260,263}. Ces propriétés font des NP de PLA d'excellentes candidates pour délivrer des ARNm aux DC directement *in vivo*.

Etude bibliographique

Ce travail de thèse a pour objectif de mettre au point une stratégie pour vectoriser des ARNm à l'aide de NP de PLA, d'analyser leurs voies de prise en charge au niveau cellulaire et tissulaire, et de caractériser leur efficacité à activer les cellules dendritiques et à induire une réponse immunitaire anti-VIH.

Objectif 1 : Vectorisation d'ARNm par des nanoparticules de PLA

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un système de vectorisation capable de véhiculer des ARNm variés à la surface des nanoparticules de PLA, tout en permettant l'expression de ces derniers en protéines antigéniques. Néanmoins, la vectorisation des ARNm sur les nanoparticules de PLA représente un défi technologique ; hydrophiles et chargés négativement, les ARNm ne peuvent être ni encapsulés, ni adsorbés directement à la surface des NP de PLA qui présentent elles aussi des charges de surface négatives. Diverses stratégies ont été testées pour répondre à cet objectif. Les meilleures formulations, au regard de la stabilité colloïdale, des taux d'adsorption et de protection des ARNm et de la charge de nanoparticules, ont été retenues pour l'objectif 2.

Objectif 2 : Analyse de la prise en charge et de l'expression des ARNm vectorisés, dans des cellules dendritiques en culture

Dans le second objectif, des transfections ont été réalisées dans des cellules dendritiques, ainsi que dans des modèles de cellules facilement transfectables pour analyser la fonctionnalité des ARNm complexés aux NP-PLA. L'expression des protéines fluorescentes a été analysée par imagerie et cytométrie en flux. De manière complémentaire, la production de l'antigène Gag a été observée par des tests d'immunofluorescence et par Western-Blot.

De plus, afin de mieux comprendre les mécanismes permettant cette expression, une analyse des mécanismes d'entrée des NP-PLA au sein de cellules dendritiques ainsi que du trafic intracellulaire a été réalisée.

Objectif 3 : Analyse de la capacité des formulations à activer les cellules dendritiques pour induire des réponses immunitaires

Dans ce troisième objectif, une étude de la maturation des cellules dendritiques primaires issues de sang humain (moDC) a été faite suite à la mise en contact des formulations d'ARNm. Pour cela, l'expression des marqueurs de maturation à la surface des moDC a été quantifiée par cytométrie en flux. En parallèle, la modulation des gènes impliqués dans l'activation des réponses immunitaires innée et adaptative ainsi que les cytokines et chimiokines relarguées par ces cellules suite à la stimulation par les formulations ont été étudiées.

Etude bibliographique

Initialement le dernier objectif de ce travail portait sur l'analyse *in vivo* de la biodistribution et la spécificité cellulaire de prise en charge des NP et l'expression des ARNm transportés, ainsi que les réponses immunitaires induites chez les souris. Cette étude n'a pas pu être réalisée au cours de ce travail et représente une des perspectives principales de cette thèse.

RESULTATS

- I. Développement d'une stratégie pour la vectorisation d'ARNm par les NP-PLA**
- II. Evaluation de l'efficacité des formulations pour l'expression des ARNm et l'activation de réponses immunitaires *in vitro*.**
- III. Mise en place des outils pour l'analyse *in vivo***

I. DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE POUR LA VECTORISATION D'ARN_m PAR LES NP-PLA

Ces trente dernières années, les nanoparticules ont été étudiées en vaccinologie pour leur capacité à délivrer des antigènes et des molécules immunostimulantes. De nombreux travaux ont démontré l'intérêt du format nanoparticulaire pour la délivrance d'ARN_m *in vitro* et *in vivo*^{233,249,320}. En effet, ce format facilite la délivrance aux organes et cellules impliqués dans les mécanismes de l'immunité et la prise en charge par les cellules présentatrices de l'antigène, telles que les cellules dendritiques (DC). De plus, les nanoparticules (NP) permettent de protéger les ARN_m des dégradations par les nucléases, permettant de favoriser leur traduction en protéines antigéniques.

La majorité des études réalisées actuellement utilise des vecteurs nanoparticulaires à base de lipides cationiques. Les liponanoparticules (LNP) ont notamment permis de grandes avancées dans le domaine de la vaccination à ARN_m. Plusieurs essais cliniques sont notamment en cours de réalisation dans les domaines de l'immunothérapie cancéreuse ou dans le cas de vaccins contre des maladies inflammatoires telles que le VIH. Cependant peu de données sont fournies pour la vectorisation des ARN_m par des nanoparticules polymériques qui présentent pourtant de nombreux avantages pour la vaccination.

Dans l'équipe, des nanoparticules basées sur l'utilisation d'un polymère biodégradable sont développées : les nanoparticules de poly(acide lactique) (NP-PLA). Leur utilisation dans le domaine de la vaccination présente de nombreux avantages, tels que leur capacité à être efficacement prises en charge par les DC et à induire des réponses immunitaires suite à des administrations parentérales^{186,254,255}. Les NP-PLA formées par nanopréciipitation ont une surface hydrophile leur conférant une stabilité dans les suspensions aqueuses et un cœur hydrophobe. Il est ainsi possible d'encapsuler à l'intérieur des NP-PLA ou d'adsorber à leur surface un antigène et/ou une molécule immunostimulante (**Figure 28**). Pour encapsuler un composant, ce dernier doit être dissout avec le polymère de PLA dans la phase organique composée d'acétone. Lors de la nanopréciipitation, le PLA va former des nanoparticules au contact de la phase aqueuse tout en encapsulant le composant dans son cœur hydrophobe. Ce type de composant doit donc nécessairement être hydrophobe et avoir une capacité de dissolution dans l'acétone. Pour l'adsorption, le composant est ajouté *a posteriori* sur les NP-PLA formées. Le composant va donc se retrouver dans un environnement hydrophile.

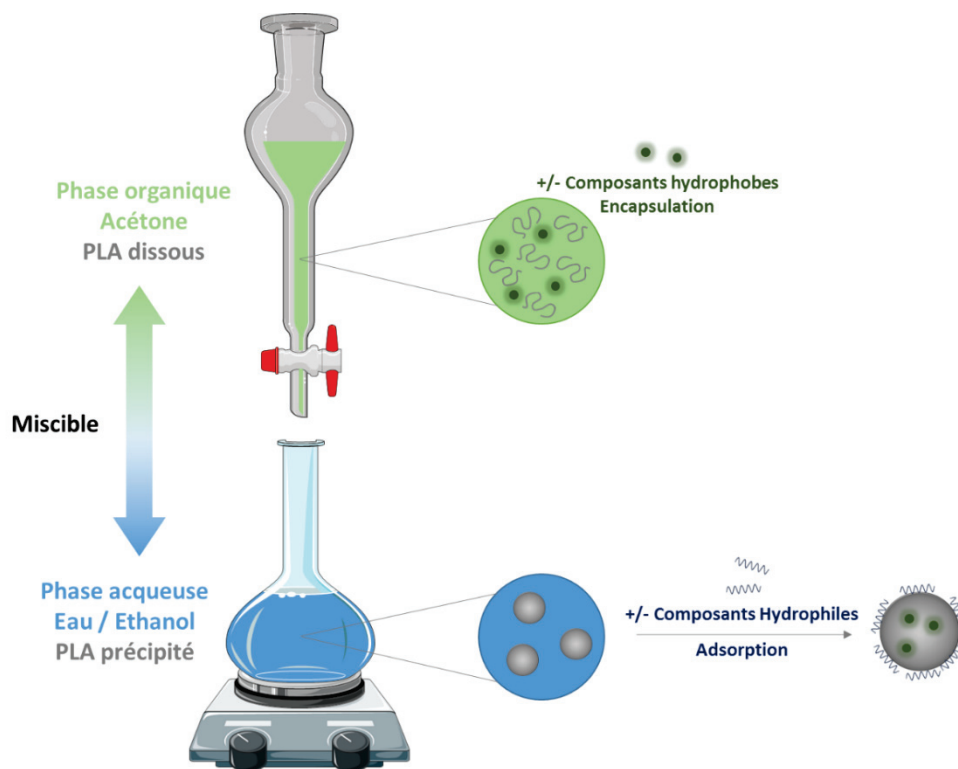


Figure 28 : Procédé d’encapsulation et d’adsorption d’antigènes et/ou de molécules immunostimulantes dans les NP-PLA.

Pour encapsuler un composant dans les NP-PLA, ce dernier est dissous dans la phase organique avec le polymère de PLA. La phase organique est ensuite coulée dans la phase aqueuse entraînant la formation de NP qui vont emprisonner dans leur cœur le composant hydrophobe. L’adsorption de composant se réalise suite à la formation des NP par des interactions entre le composant hydrophile et la surface de la particule.

Les ARNm sont des biomolécules hydrophiles chargées négativement. Leur vectorisation par les NP-PLA représente donc un défi technique. Dans le but de vectoriser les ARNm, diverses stratégies ont été évaluées au cours de ce travail de thèse. Ces stratégies sont réparties en 3 principales catégories :

- L’encapsulation des ARNm dans les NP-PLA.

- L’adsorption des ARNm sur les NP-PLA *via* l’interaction naturelle entre la protéine Rev et la séquence d’ARN non-codante RRE²⁶⁹. Cette stratégie est basée sur une interaction entre séquences spécifiques.

- L’adsorption des ARNm sur les NP-PLA *via* des protéines et peptides cationiques. Ces intermédiaires vont interagir avec l’ARNm par l’action d’interactions électrostatiques.

1. Encapsulation des ARNm dans les NP-PLA

1. Introduction

L'encapsulation d'antigènes et notamment d'acides nucléiques dans le cœur des nanoparticules est la méthode de choix pour prévenir au mieux la dégradation de la molécule. L'encapsulation de composants dans le cœur des NP-PLA nécessite l'utilisation de molécules solubles en acétone et insoluble en phase aqueuse. Cependant, les acides nucléiques, et notamment les ARNm, présentent des caractéristiques inverses.

Dans cette première partie, nous avons tout de même testé cette stratégie pour permettre la vectorisation des ARNm par les NP-PLA synthétisées au sein de l'équipe.

2. Matériels et méthodes

a. Production des ARNm

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARNm pour les tests d'encapsulation, les ARNm totaux de cellules HEK293 ont été extraits et purifiés par utilisation d'un réactif Trizol (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, des cellules HEK293 ont été cultivées dans du milieu complet composé de DMEM (Gibco) et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) à 37 °C et 5 % de CO₂ en flacon de culture. Lorsque les cellules ont atteint les 80 % de confluence, elles ont été lysées par ajout de 6 mL de Trizol puis le lysat cellulaire a été centrifugé 10 min à 12000 g et 4 °C. Suite à l'ajout de chloroforme, la suspension a été mélangée vigoureusement et centrifugée afin de séparer les différents composants cellulaires. La phase aqueuse contenant les ARNm a été isolée, traitée à la DNase I (Thermo Fischer Scientific) et les ARNm ont été précipités par utilisation d'isopropanol 100 %. Suite à un lavage à l'éthanol, les ARNm ont été resuspendus en eau ultra pure (Ambion) et dosés par analyse spectrophotométrique à 260 nm.

b. Synthèse des nanoparticules

L'élaboration des NP de PLA a été réalisée par une méthode de nanopréciipitation²⁵³. Le polymère a été dissous dans une solution d'acétone à 2 % w/v dans un flacon en verre placé sous légère agitation. Les ARNm ont été ajoutés à cette solution à une concentration de 540 ng/ μ L dans un volume de 560 μ L en absence ou présence de 50 μ g de phosphatidylcholine (Sigma Aldrich). Le mélange PLA/ARNm en acétone a été placé dans une burette graduée et coulé dans une phase aqueuse comprenant 60 % d'eau et 40 % d'éthanol sous légère agitation. Les solvants ont ensuite été évaporés sous vide. Les NP obtenues ont été caractérisées, puis conservées à 4 °C dans un flacon en verre.

Résultats

c. Caractérisation des NP-PLA

Le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité des particules ainsi que la charge de surface ont été déterminés à 25 °C par diffusion dynamique de la lumière (DLS) dans une solution de particules diluées dans 1 mM de NaCl en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). Quatre mesures indépendantes sont réalisées pour obtenir les valeurs moyennes.

d. Dosage des ARNm

Dosage indirect : Les NP-PLA formées ont été centrifugées 15 min à 16000 g à deux reprises. La quantité d'ARNm présents dans le surnageant a été dosée par analyse spectrophotométrique à 260 nm par utilisation d'un Nanodrop (Thermo Scientific).

Dosage direct : Les NP-PLA formées ont été centrifugées 15 min à 16000 g à deux reprises et le surnageant a été éliminé. Les NP-PLA ont été dissoutes par ajout de 500 µL de chloroforme (VWR). Après ajout de 100 µL d'eau ultra-pure (Ambion, France), la suspension a été mélangée vigoureusement et centrifugée 5 min à 16000 g afin d'extraire les ARNm. Les ARNm présents dans la phase aqueuse ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm.

3. Résultats

a. Les ARN ne peuvent pas être encapsulés seuls dans les NP-PLA

Tout d'abord, la capacité d'encapsulation des ARN seuls a été testée. Pour cela, 300 µg d'ARN ont été dissous dans 560 µL d'eau, volume maximal d'eau pouvant être utilisé sans perturbation de la réaction de nanopréciptation. Cette solution a été ajoutée à la solution de PLA dissout en acétone. Suite à la nanopréciptation, la suspension de NP obtenue a été évaporée. Les NP-PLA ont été caractérisées et la quantité d'ARN encapsulés a été évaluée (**Tableau VII**).

Tableau VII : Propriétés des NP-PLA encapsulant les ARN seuls.

Molécules encapsulées	Taille (en nm)	IP	Potentiel de surface (en mV)	ARN dans le surnageant	ARN dans les NP-Rendement PLA	Rendement d'encapsulation
Aucune	197	0,066	- 61,6	-	-	-
ARN total	287	0,212	- 34,6	125 µg + précipités	0 µg	0 %

L'ajout d'ARN lors de la nanopréciptation conduit à une augmentation de la taille, de l'indice de polydispersité et de la charge de surface des NP-PLA. Cependant, cet ajout a également induit la formation d'un précipité adhérent sur les parois du matériel en verre utilisé lors de la réaction. Suite à la centrifugation des NP-PLA obtenues, le dosage des ARN présents dans le surnageant a révélé la présence de 125 µg d'ARN, soit 50 % de l'ARN introduit dans la réaction. Le dosage direct de l'ARN

Résultats

présent à l'intérieur des NP-PLA formées a montré une absence d'ARNm. La quantité d'ARN dans le surnageant, les précipités formés lors de la réaction ainsi que l'absence d'ARN dans les NP-PLA reflètent une absence d'encapsulation de l'ARN.

b. L'ajout d'additif n'améliore pas la capacité d'encapsulation des ARN

Seuls, les ARN ne semblent pas se dissoudre correctement dans l'acétone ce qui conduit à la formation de précipités. Afin de favoriser l'encapsulation, nous avons par la suite évalué l'intérêt de l'ajout d'un additif : la phosphatidylcholine, une molécule comportant une tête polaire et une queue hydrophobe. Par utilisation de cet additif, nous avons cherché à augmenter la capacité de dissolution de l'ARNm en acétone et favoriser la liaison de l'ARN au PLA lors de la nanoprecipitation. Pour réaliser l'encapsulation, 300 µg d'ARN ont été dissous en eau en présence de phosphatidylcholine. Cette suspension a été ajoutée à la solution de PLA dissout en acétone puis coulée sur la phase aqueuse pour former les NP-PLA. Comme précédemment, les NP-PLA ont été caractérisées et la quantité d'ARN encapsulés a été analysée (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Propriétés des NP-PLA encapsulant les ARNm en présence de phosphatidylcholine.

Molécules encapsulées	Taille (en nm)	IP	Potentiel de surface (en mV)	ARN dans le surnageant	ARN dans les NP-PLA	Rendement d'encapsulation
Aucune	197	0,066	- 61,6	-	-	-
ARN total + P-Choline	186,8	0,081	- 54,6	155 µg + précipités	0 µg	0 %

P-Choline = phosphatidylcholine

L'ajout de phosphatidylcholine dans la réaction de nanoprecipitation n'améliore pas le rendement d'encapsulation. En effet, comme pour les tests d'encapsulation de l'ARN seul, des précipités ont été observés sur les parois du matériel utilisé et l'ARN introduit n'a été détecté qu'à l'extérieur des NP-PLA.

4. Discussions

L'encapsulation d'ARNm au cœur de NP est une stratégie prometteuse pour la protection de ces dernières faces aux dégradations ainsi que leur délivrance de manière prolongée dans le temps. Bien que l'encapsulation d'ADN plasmidique dans le cœur de NP de poly(acide lactique co-glycolique) (PLGA) ait pu être réalisée^{321,322}, cette méthode ne semble pas applicable aux NP polymériques de PLA élaborées au sein de l'équipe pour des raisons physico-chimiques. Bien que la phosphatidylcholine semble avoir aidé à dissoudre l'ARNm, l'encapsulation d'ARNm n'a pas pu être réalisée.

Cette stratégie n'a pas été retenue pour vectoriser les ARNm antigéniques dans ce projet.

2. Adsorption *via* l'interaction naturelle entre la protéine Rev et la séquence ARNm RRE

1. Introduction

Pour vectoriser des ARNm en utilisant des NP-PLA, une stratégie basée sur l'adsorption des ARNm par l'intermédiaire de l'interaction naturelle entre la protéine Rev (*Regulator of Expression of Virion*) et le motif d'ARN non-codant RRE (*Rev Responsive Element*) du VIH-1 a été évaluée.

Le génome du VIH-1 est composé de trois gènes codant des protéines de structure, de deux gènes codant des protéines régulatrices et de quatre gènes codant des protéines accessoires. Parmi ces protéines, la protéine régulatrice Rev du VIH-1 joue un rôle essentiel dans le cycle viral du virus (**Figure 29**)³²³. Cette protéine, une fois synthétisée, va entrer dans le noyau de la cellule hôte et se lier spécifiquement aux séquences d'ARN viraux non ou partiellement épissés par l'intermédiaire de la séquence non-codante RRE présente sur ces ARNm. Cette interaction va alors favoriser l'export nucléaire de ces derniers. Par l'interaction naturelle entre la protéine Rev et la séquence ARN RRE, les ARNm viraux vont donc se retrouver dans le cytoplasme où ils seront à leur tour traduits en protéines fonctionnelles.

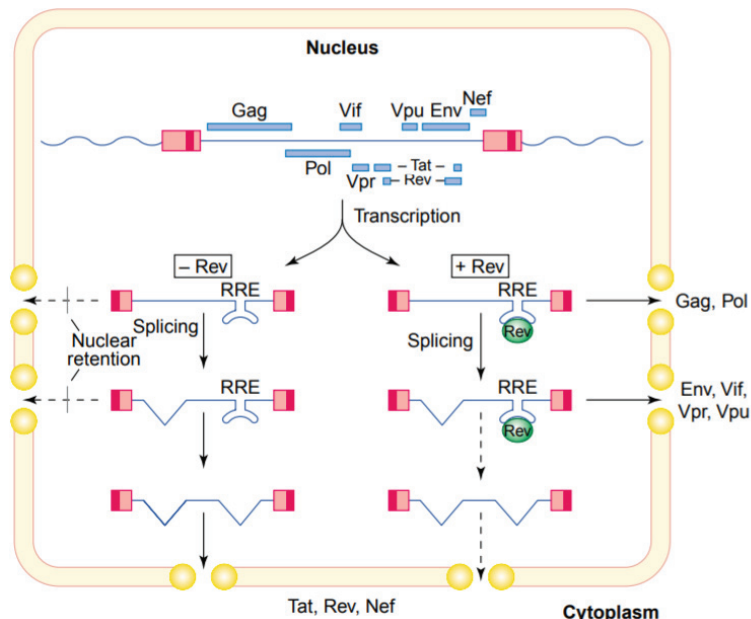


Figure 29 : Fonction de la protéine Rev pour l'export des ARNm lors de la réplication du VIH-1
(Adapté de B. Cullen, 2003³²³).

Suite à l'intégration du génome viral du VIH-1, l'ADN va être transcrit en ARN. En absence de la protéine Rev, seuls les ARNm codants pour les protéines régulatrices Tat, Nef et Rev vont être exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines fonctionnelles. La protéine Rev, une fois synthétisée, va pénétrer dans le noyau de la cellule hôte et se lier à des motifs spécifiques des ARNm : les séquences d'ARN non codantes RRE. Cette liaison va permettre l'export des ARNm codants pour les protéines de structures et accessoires dans le cytoplasme. Ces ARNm vont alors être à leur tour traduits en protéines virales permettant la formation d'un nouveau virion.

Résultats

Des études se sont intéressées aux mécanismes d'interaction entre la protéine Rev et l'ARNm RRE^{324,325}. Ces études ont permis de démontrer que seules certaines régions de la protéine et de l'ARNm étaient nécessaires à leur interaction. Au niveau de la protéine, une courte région peptidique de 17 acides aminés comprenant un motif riche en arginine semble importante à la liaison avec l'ARNm. Cette région se situe entre les acides aminés 38 et 49 de la protéine Rev. A partir de cette courte séquence, deux peptides ont été développés : le peptide que l'on nommera RevMin, correspondant à la séquence minimale de la protéine Rev nécessaire à l'interaction, et le peptide synthétique RSG 1.2 enrichi en arginine (**Figure 30A**)³²⁶⁻³²⁹. Au niveau de la séquence de l'ARNm RRE, la boucle Stem IIB est décrite comme séquence principale pour permettre l'interaction^{324,327,330} (**Figure 30B**).

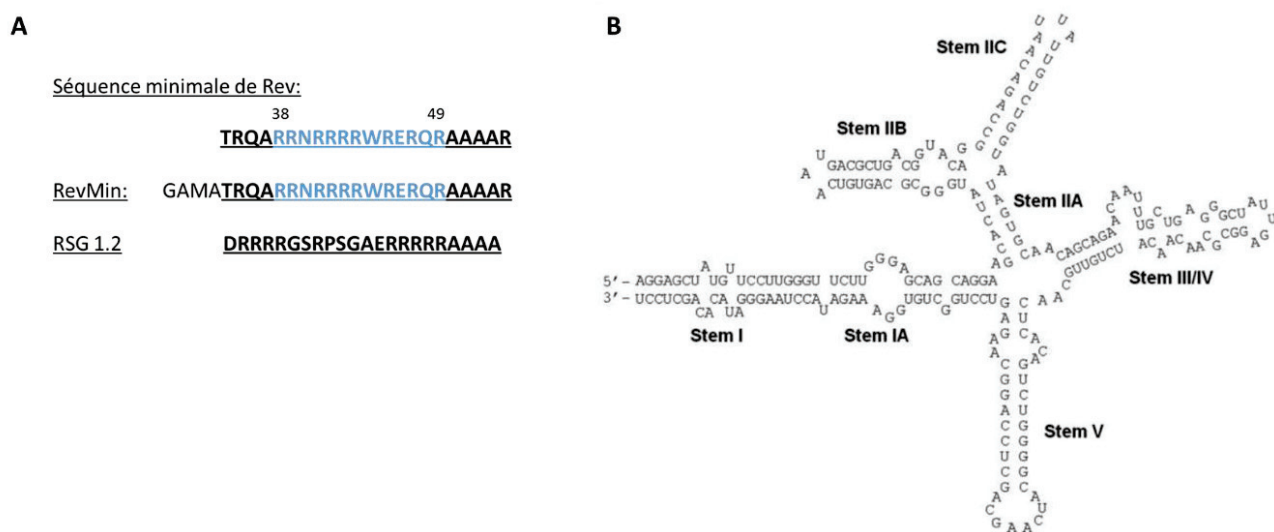


Figure 30 : Séquences des peptides Rev et de l'ARN RRE nécessaires à l'interaction entre les deux composants. (A) Séquences d'acides aminés des peptides Rev. La séquence minimale permettant l'interaction avec l'ARN RRE est soulignée. La séquence riche en arginine comprise entre les acides aminés 38 et 49 de la protéine Rev est en bleu. (B) Séquence de l'ARN RRE utilisé pour le design de l'insert³³¹. Cette séquence représente la séquence minimale permettant l'interaction avec la protéine Rev. Elle provient de la séquence du génome de HIV-1 de la souche HxB2. La boucle Stem IIB est le site le plus affiné pour l'interaction avec la protéine Rev.

Dans cette stratégie, nous avons exploité cette interaction naturelle pour permettre l'adsorption des ARNm sur les NP-PLA synthétisées au sein de l'équipe. Ce système de vectorisation est basé sur l'utilisation de peptides Rev capables d'interagir avec les NP-PLA et d'un ARNm antigénique porteur de la séquence RRE. Pour évaluer cette stratégie, nous avons donc produit des ARNm antigéniques couplés à la séquence non-codante RRE et utilisé des peptides dérivés comportant les motifs minimums nécessaires à l'interaction. Deux stratégies ont été testées en parallèle : (1) La première est basée sur l'adsorption en couche successive des composants : les peptides sont adsorbés sur les NP-PLA, puis les ARNm sont additionnés. (2) Dans la seconde stratégie, un complexe peptides / ARNm est formé, puis ce complexe est adsorbé sur les NP-PLA.

Ce travail a été réalisé avec l'aide de deux stagiaires pour lesquelles j'ai participé à l'encadrement (Eugénie Moulin et Gwenaëlle Humbert), de Céline Coiffier et de Simon Megy.

2. Matériels et méthodes

a. Production des ADN plasmidiques

Dans cette étude, les plasmides pGEM4z-HxB2gag-64A (fournis par l'équipe du Pr Guido Vanham, Université d'Anvers, Belgique) codant pour l'antigène gag, pcDNA3-eGFP (Addgene) codant pour la protéine fluorescence eGFP et le plasmide contenant l'insert RRE-40A développé au sein de l'équipe et produit par GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés.

Les vecteurs et inserts ont été linéarisés par des enzymes de restriction appropriées. Suite à une migration sur gel d'agarose 0,8 % - TBE 1X, les bandes d'ADN de tailles attendues ont été récupérées et purifiées en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCRClean-up Gel (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Pour réaliser la ligation, le vecteur et l'insert purifié ont été combinés dans une proportion 1 : 3 (50 ng de vecteur : 150 ng d'insert dans un volume final de 10 µL). Pour cela, 10 µL de tampon 2X Quick Ligation Reaction Buffer et 1 µL de ligase Quick T4 DNA Ligase (NEB) ont été ajoutés. Après une incubation de 5 min à température ambiante, le produit obtenu a été conservé à -20 °C jusqu'à la transformation bactérienne.

Pour la transformation, 50 µL de bactéries compétentes (*Escherichia coli* C3040I ; NEB) et 2 µL de produit de ligation ont été mis en contact et incubés sur glace 30 min, 30 sec à 42 °C puis 2 min sur glace. Les bactéries obtenues ont été cultivées sur une boîte contenant du *Lysogeny broth* (LB) et de l'Ampicilline (25 µg/mL ; Sigma) et mises en culture à 37 °C sur la nuit. Après sélection de clones et amplification dans un milieu de culture LB-liquide avec Ampicilline, l'ADN plasmidique a ensuite été purifié en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

Les ADN plasmidiques purifiés ont été dosés par spectrométrie (Nanodrop ; Thermo Scientific) et conservés à -20 °C. Une vérification du clonage a été réalisée par cartographie de restriction, puis par séquençage (GATC ; Eurofins Genomics).

b. Production des ARNm

Les ADN plasmidiques ont été linéarisés en aval de la queue poly-A par utilisation de l'enzyme BspQI (NEB) et XbaI (NEB) pour les plasmides pGEM4a-eGFP-RRE-40A et pcDNA3-eGFP, respectivement. Les ADNp linéarisés ont été purifiés sur gel d'agarose par utilisation du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Gel (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

La synthèse d'ARN messenger a été réalisée avec le kit Ambion mMMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion), selon les recommandations du fournisseur. Après traitement

Résultats

à la DNase I (Ambion) 15 min à 37°C, l'ARNm synthétisé a été précipité au chlorure de lithium pendant minimum 1 h à -20 °C. Le culot d'ARN a été rincé à l'éthanol et resuspendu dans 20 µL d'eau et conservé à -20°C. Les ARNm obtenus ont été dosés par spectrométrie à 260 nm (Nanodrop ; Thermo Scientific) et la qualité des ARNm a été vérifiée sur gel d'agarose.

Un ARNm contrôle codant pour une protéine eGFP stabilisée a été produit et fourni par l'équipe du Pr Guido Vanham (Université d'Anvers, Belgique).

c. Protéines et peptides Rev utilisés

La protéine utilisée dans l'étude préliminaire de couplage est une protéine Rev de fusion (Rev Mal E) ayant les mêmes propriétés que la protéine sauvage mais comportant la partie Mal E qui la rend plus soluble que la protéine native. Cette protéine a été conservée à -80 °C dans un tampon phosphate 20 mM pH7,5 en présence de 1 M NaCl.

Les peptides Rev Min (GAMATRQARRNRRRRWRERQRAAAAR) et Rev RSG (DRRRRGSRPSGAERRRRRAAAA) ont été produits par GenScript (China). Ces peptides ont été dissous en eau puis conservés à -80 °C.

d. Formulation des ARNm sur les NP-PLA par l'intermédiaire des peptides Rev

Stratégie 1 : Formation des complexes NP-PLA/peptide puis ajout des ARN

Pour réaliser les formulations, les NP-PLA (Adjuvatis, France) à diverses concentrations ont été mises en contact en goutte à goutte rapide avec les peptides dilués aux diverses concentrations testées, volume à volume, dans un tube Eppendorf à fond rond. Le mélange a été incubé sur roue pendant 2 h à température ambiante.

Les ARNm à différentes concentrations ont ensuite été ajoutés sur le complexe NP-PLA/Peptide volume à volume afin de respecter différents ratios de concentrations : peptide RevMin à 100 ng/µL : ARNm à 50, 25 ou 12,5 ng/µL pour les ratios 2 :1, 4 :1 et 8 :1 respectivement ou peptide Rev RSG à 60 ng/µL : ARNm à 30, 15 ou 7,5 ng/µL pour les ratios 2 :1, 4 :1 et 8 :1 respectivement. La formulation a été incubée sur roue pendant 30 min à température ambiante.

Stratégie 2 : Formation d'un complexe Peptide/ARNm puis adsorption sur les NP-PLA

Les peptides à différentes concentrations ont été ajoutés volume à volume en goutte à goutte rapide sur les ARNm afin de respecter différents ratios de concentrations : peptide RevMin ou Rev RSG à 25, 100, 200 ou 300 ng/µL : ARNm à 25 ng/µL pour les ratios 1 :1, 4 :1, 8 :1 et 12 :1 respectivement. Ce mélange a été incubé 5 min à température ambiante puis conservé à 4 °C.

Résultats

Les NP-PLA (Adjuvatis, France) ont été ajoutées aux complexes peptide/ARN volume à volume et incubées 1h sur roue à température ambiante.

Tampon de formulations :

Plusieurs tampons de formulation ont été testés : eau ultra pure (Ambion), PBS 1X (Euromedex), Tampon carbonate à pH11 avec ou sans NaCl à diverses concentrations, Tampon Phosphate à pH6 avec ou sans NaCl à diverses concentrations.

e. Caractérisation des formulations

Pour caractériser les NP-PLA, 15 μ L de suspension ont été prélevées et diluées dans du NaCl 1 mM pour réaliser une caractérisation au Zetanosizer Nano ZS (Malvern Instrument). Quatre mesures indépendantes sont réalisées pour obtenir les valeurs moyennes.

Pour doser les peptides résiduels non liés, 300 μ L de la suspension ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à deux reprises. Un dosage colorimétrique des peptides présents dans le surnageant a été réalisé par la méthode μ BCA (dosage de l'acide bicinchronique ; μ BCA protein Assay Kit ; ThermoScientific), selon les recommandations du fournisseur. Les valeurs obtenues nous ont permis de déterminer le rendement d'adsorption ($[PLA]$ en μ g/mL inséré dans la réaction $\times 100 / [Peptide]$ en μ g/mL) et le taux de chargement de peptide par particules qui prend en compte la quantité et le taux de solide des particules insérées dans la réaction.

Une analyse des complexes sur gel retard a également été réalisée. Un traitement à l'héparine puis protéinase K a été appliqué dans certaines conditions dans le but de dissocier les complexes de la surface des NP-PLA et de dégrader les peptides respectivement. Pour cela, les échantillons ont été traités par de l'héparine (Sigma) pendant 1 h à température ambiante puis 30 min à 56°C avec de la protéinase K (NEB). Chaque échantillon (traité ou non) contenant 100 ng d'ARNm (ou les volumes équivalents pour les contrôles) a été déposé sur un gel d'agarose 0,8 % en présence de BET (Gene Scientific). La migration a été effectuée dans du tampon TBE 1X (Euromedex) pendant 30 min à 135 V. Le gel a été révélé par lecteur UV.

f. Tests de fonctionnalité des formulations en cellules

Les cellules DC2.4, lignée de cellules dendritiques issues de sang de souris³³², ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide et à 5% CO₂, dans du milieu de culture RPMI / glutamax (Gibco) supplémenté par 10% SVF (Gibco), 2- β -mercaptoéthanol (50 μ M), Hepes (1 mM) et L-glutamine (2mM). D'autre part, les cellules HEK293 (des cellules épithéliales embryonnaires du rein (ATCC)),

Résultats

des cellules facilement transfectables, ont été utilisées. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) supplémenté par 10% SVF (Gibco).

Pour tester la fonctionnalité des ARNm vectorisés par les formulations, 150 000 cellules ont étéensemencées la veille de la transfection dans une plaque 24 puits dans un volume final de 500 μ L. Après élimination du milieu de culture, du milieu sans sérum (500 μ L) et contenant de la pénicilline (100 U/ml) / streptomycine (100 μ g/ml) (Gibco) a été ajouté dans chaque puits. Le volume adéquat d'échantillon a été ajouté pour avoir une concentration d'ARNm finale de 160 ng. Les agents commerciaux Trans IT mRNA Transfection Kit (Mirus) et Stemfect RNA transfection Kit (Stemgent) ont été utilisés pour réaliser les contrôles positifs de transfection. La plaque a été incubée 4 h à 37°C, 5% de CO₂ puis le milieu de culture a été changé par 500 μ L de milieu de culture contenant du sérum. La plaque a été incubée 16 h à 37°C puis observée au microscope à fluorescence (Nikon TiE). Les images ont été analysées par le logiciel ImageJ.

3. Résultats

a. Design d'un ARNm antigénique fonctionnel portant la séquence d'ARN RRE

Pour permettre la vectorisation des ARNm antigéniques par l'interaction avec la protéine Rev, nous avons tout d'abord créé un insert de séquence ADN qui contient la séquence de l'ARN RRE correspondante. Pour cela, nous avons choisi la séquence d'ARN RRE non codante minimale permettant l'interaction avec Rev. Cette séquence, issue du génome du VIH-1 (souche HxB2), présente de nombreuses structures secondaires. A cette séquence, plusieurs modifications stabilisatrices ont été ajoutées (**Figure 31A**). Au niveau du site d'initiation de la traduction, une séquence Kozac a été ajoutée afin de favoriser la traduction de l'ARNm en protéine antigénique. Ce motif est suivi d'une partie de la séquence du gène codant la protéine eGFP pouvant être remplacée par la séquence codant l'antigène souhaité. Pour cela, plusieurs sites d'enzyme de restriction ont été ajoutés. Une séquence *spacer* non codante a été ajoutée entre la séquence codante et la séquence RRE. En aval de la séquence de l'ARN RRE, la région 3'UTR de la β -globine du Xénope ainsi que 40 adénosines ont été ajoutées. Ces deux structures sont connues pour favoriser la stabilité de l'ARNm et la traduction en protéine. Les sites d'enzyme de restriction de type *IIS BtgZI et BspQI* (permettant la linéarisation à l'extrémité 3' de la queue poly-A), suivis de divers sites de restriction couramment utilisés terminent la séquence. Cet insert a été produit par GenArt et cloné dans le plasmide pGEMz disponible au sein de l'équipe. Le plasmide obtenu a été appelé pGEM4a-RRE-40A. La séquence codant la protéine eGFP a été clonée dans ce vecteur pour permettre d'évaluer cette stratégie de vectorisation.

Résultats

Afin de vérifier la fonctionnalité de l'ARNm suite à l'ajout de la séquence RRE, ce dernier a été transfecté dans des cellules HEK293, un modèle cellulaire facilement transfectable, avec un agent commercial lipidique (Stemfect) (**Figure 31B**). Nous pouvons voir que l'ARNm eGFP couplé à la séquence non codante RRE et vectorisé par l'agent commercial lipidique est traduit efficacement en protéine eGFP. La présence de la séquence RRE n'altère pas la fonctionnalité des ARNm ainsi produits. Dans cette première partie, nous avons ainsi produit un ARNm fonctionnel portant la séquence RRE. Cet ARNm a été utilisé pour le développement d'une stratégie de vectorisation par les NP-PLA. Comme décrit précédemment, deux approches de couplage ont été utilisées.

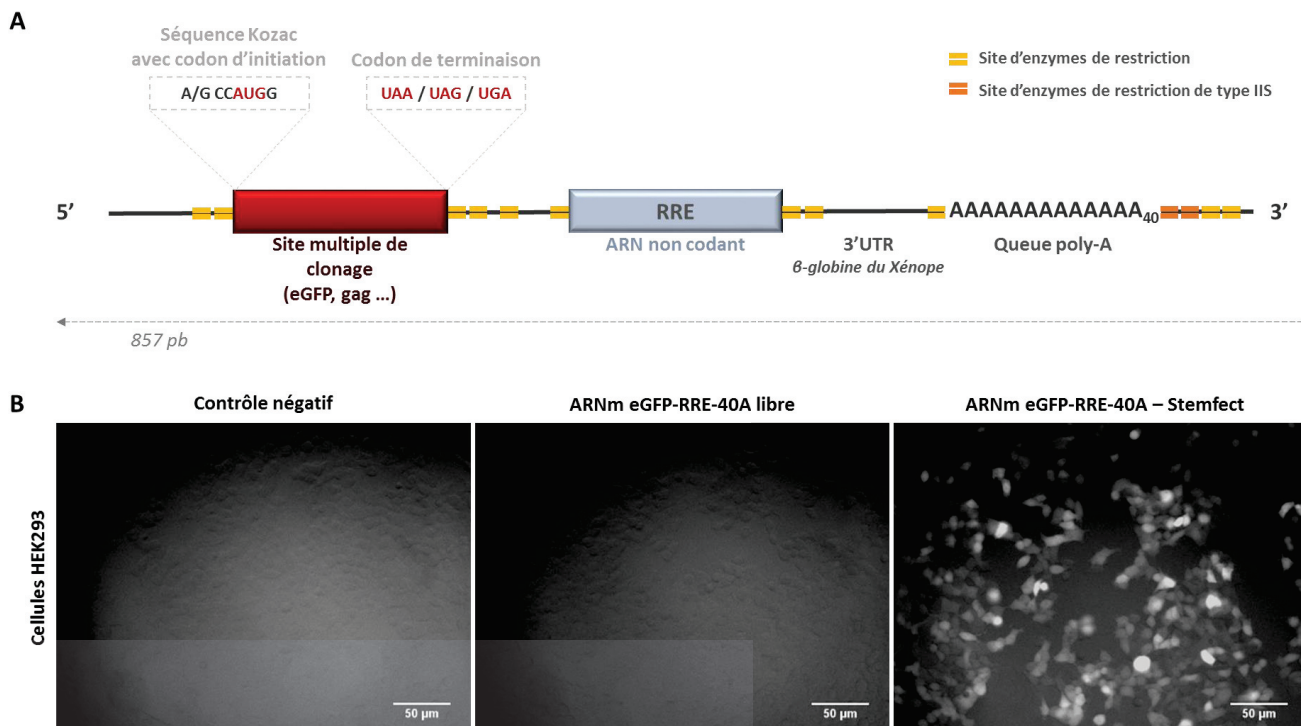


Figure 31 : Structure et fonctionnalité de l'ARNm antigénique portant la séquence non-codante RRE.

(A) Schéma de l'insert développé pour permettre l'interaction des ARNm antigéniques au NP-PLA par l'intermédiaire de l'interaction ARN RRE / protéine Rev. L'insert comporte : un site permettant le clonage des séquences ADN codant l'antigène d'intérêt encadré de plusieurs sites de restriction, les séquences non-codantes de l'ARN RRE et de la région 3'UTR de la β -globine du Xénope, une queue poly-A et des sites de restriction permettant la linéarisation en aval de la queue poly-A (site en orange). Plusieurs sites de restriction ont été ajoutés afin de modifier la séquence et de cloner l'insert dans le vecteur voulu. (B) Analyse de la fonctionnalité de l'ARNm eGFP-RRE-40A dans les cellules HEK293. Les cellules ont été analysées par microscopie 16 h après ajout de PBS 1X (contrôle négatif) ou de 160 ng d'ARNm nu ou vectorisé par le Stemfect, un agent commercial.

b. Couplage des ARNm portant la séquence RRE au NP-PLA par l'intermédiaire des peptides Rev en couche par couche

Cette première approche consiste en l'adsorption des composants en couche par couche : dans un premier temps les peptides sont adsorbés à la surface des NP-PLA puis les ARNm antigéniques sont adsorbés sur les NP-PLA recouvertes (**Figure 32**).

Dans une étude préliminaire et dans le but de valider le concept de cette stratégie, une protéine Rev de grande taille disponible au sein de l'équipe a été utilisée. Cette protéine a pu être adsorbée à

Résultats

la surface des NP-PLA avec un rendement de plus de 90 % (données non montrées). Cependant, la taille de la protéine (> 40 kDa) pouvant influencer les capacités de formulations des ARNm, nous avons préféré évaluer l'intérêt de cette stratégie avec les peptides RevMin et Rev RSG.

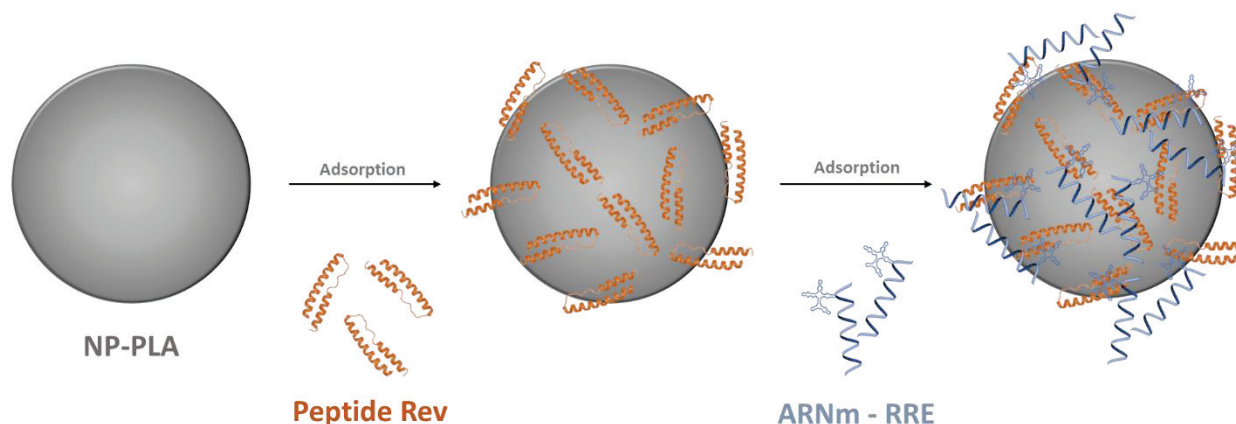


Figure 32 : Schéma de la stratégie de vectorisation basée sur l'adsorption en couche par couche des composants. Dans cette stratégie, le peptide Rev est adsorbé à la surface des NP-PLA puis l'ARNm portant la séquence RRE est ajouté pour permettre leur interaction sur les NP-PLA.

Pour obtenir une formulation stable, différents paramètres ont été optimisés : les concentrations en peptides, NP-PLA et ARNm à mettre en contact ainsi que le temps d'incubation et les tampons de réactions. Pour l'ensemble de ces analyses, plusieurs paramètres ont été évalués. La taille, l'indice de polydispersité (IP) et le potentiel zêta, reflétant la charge de surface, ont été mesurés. En effet, lors de l'adsorption d'un composant à la surface des NP-PLA, une variation de ces trois paramètres est attendue. Au sein de l'équipe, nous cherchons à obtenir des formulations vaccinales avec une forte stabilité colloïdale et un IP maximum de 0,1. De plus, le taux de chargement des peptides sur les NP-PLA (en mg de peptide/g de NP-PLA) et le rendement d'adsorption (en %) ont été analysés par réalisation de dosage protéique indirect. En théorie, ces deux paramètres évoluent en sens opposé³³³ : le rendement augmente avec le taux de NP car on a plus de surface disponible pour adsorber les peptides, alors que la capacité d'adsorption (qui rend compte de la surface de NP recouverte) diminue. La quantité de NP-PLA optimale correspond à la masse de particules où l'on obtient le meilleur compromis entre ces deux valeurs.

Détermination de la quantité optimale de peptides Rev

Tout d'abord, la quantité la plus adaptée de peptides nécessaires à la formulation de particules homogènes et stables a été déterminée pour chaque peptide. Pour cela, des concentrations variées de peptides Rev ont été adsorbées à la surface des NP-PLA en quantité fixe et les paramètres décrits précédemment ont été analysés (**Figure 33A-B**). Pour les deux peptides, nous pouvons observer qu'à la concentration de 50 µg/mL de peptides, aucune variation attendue au niveau de la taille, de l'IP et de la charge de surface n'est observée. En revanche, pour les concentrations testées les plus hautes, nous avons pu voir une floculation des formulations correspondant à une agrégation des particules entre elles. Ces concentrations n'ont donc pas été sélectionnées pour les formulations. Pour le peptide

Résultats

Rev Min, une taille et un IP élevé (388 nm et 0,370 respectivement) ont été obtenus à la concentration de 75 µg/mL de peptides. Ces modifications peuvent corrélérer avec une tendance à la floculation et ne sont pas en accord avec les attentes du laboratoire en terme de formulations. Aux concentrations de 60 µg/mL et 100 µg/mL pour les peptides Rev Min et Rev RSG respectivement, la taille et l'IP sont correctes. De plus, à ces concentrations, nous pouvons observer de bons rendements d'adsorption (> à 90%) et un taux de chargement correct (5,5 et 7,1 µg de peptide / g de PLA pour les peptides Rev Min et RSG, respectivement). Les concentrations de 60 µg/mL pour le peptide Rev Min et de 100 µg/mL pour le peptide Rev RSG ont été choisies. A ces concentrations, un bon compromis entre le rendement d'adsorption, le taux de chargement et l'aspect des complexes est observé.

Nous pouvons noter que pour chacun des deux peptides, la quantité adsorbée ne suffit pas à inverser la charge des NP-PLA. L'interaction avec les ARNm chargés négativement devra nécessairement se faire *via* la spécificité d'interaction entre les peptides Rev et la portion d'ARN RRE.

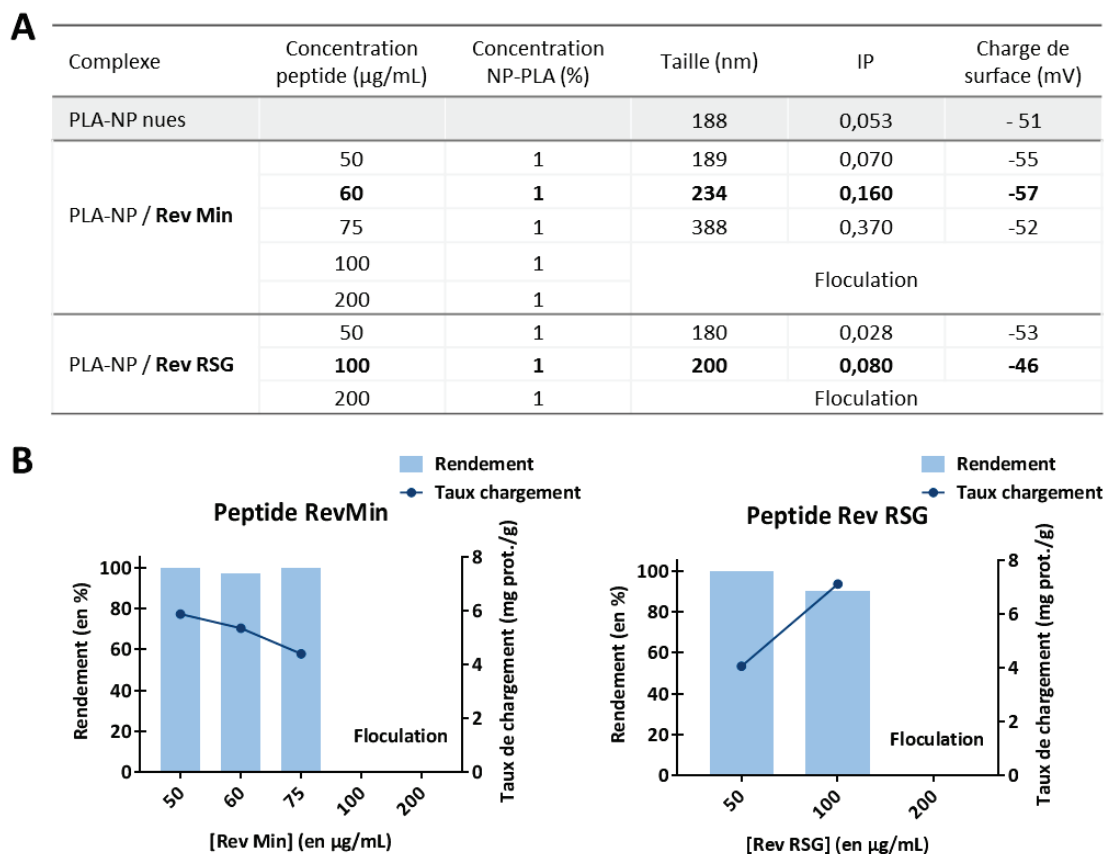


Figure 33 : Détermination de la quantité optimale de peptide Rev Min et Rev RSG dans les formulations.

(A) Mesures de la taille, de l'indice de polydispersité (IP) et de la charge de surface des NP-PLA nus ou adsorbant à leur surface le peptide Rev Min ou Rev RSG à différentes concentrations. En gras sont indiquées les formulations retenues suite à cette étude. (B) Variations du rendement d'adsorption (barre en bleu clair) et du taux de chargement (courbe en bleu foncé) de peptides Rev Min ou Rev RSG à la surface des NP-PLA en fonction de la concentration en peptide. Ces données sont obtenues suite au dosage indirect de la quantité de peptide résiduelle non adsorbée par dosage colorimétrique. L'adsorption des peptides a été réalisée en tampon carbonate (pH11) avec un taux fixe de NP-PLA de 1% pendant une durée de 2h.

Résultats

Détermination de la quantité optimale de NP-PLA

Dans un second temps, nous avons déterminé le taux de solide en particules le plus adapté pour avoir des formulations stables. Le taux de solide représente la concentration massique de polymère dans la suspension de NP finale. Pour évaluer ce taux, nous avons fait varier la quantité de NP-PLA en gardant le taux de peptide optimal déterminé dans le paragraphe précédent. Les mêmes paramètres que précédemment ont été analysés pour le peptide Rev Min et RSG (**Figure 34A-B**).

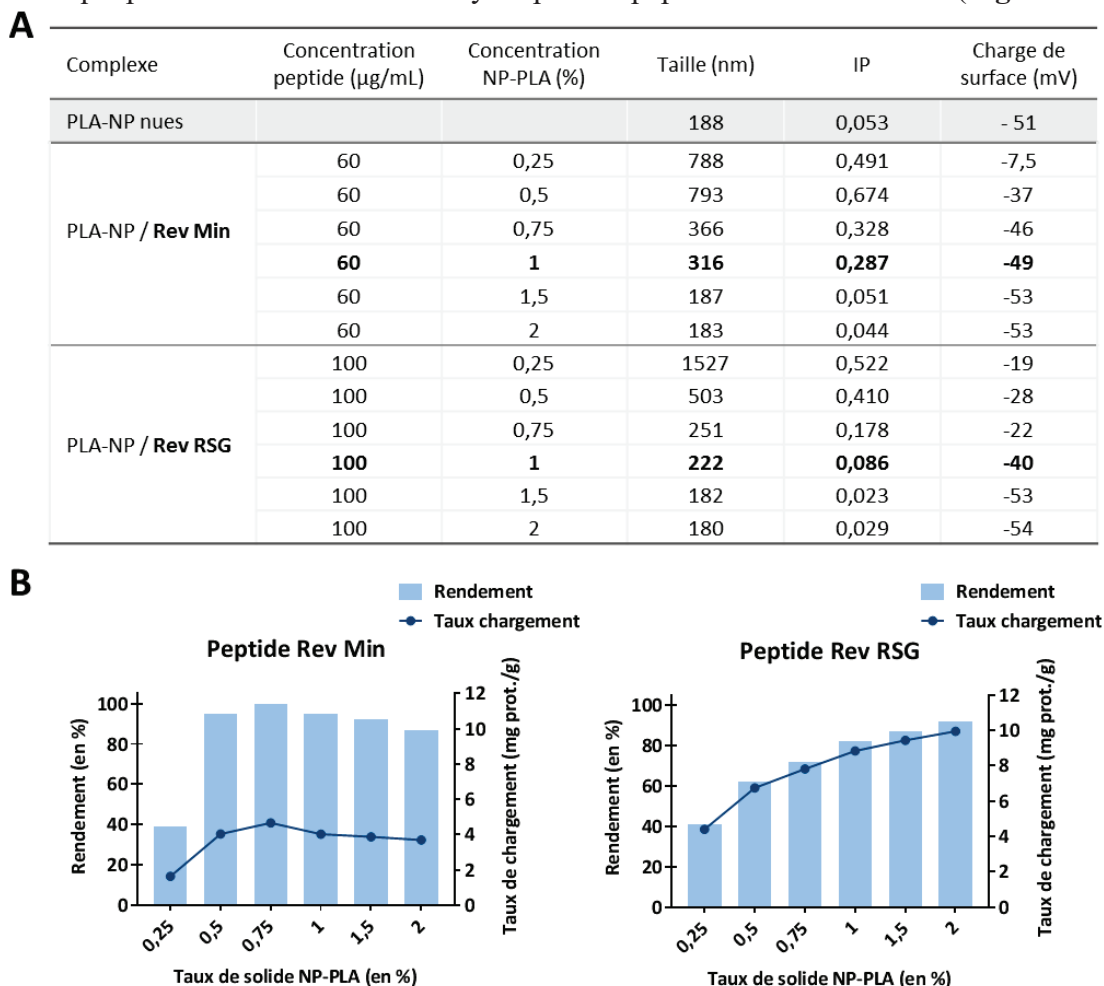


Figure 34 : Détermination de la quantité optimale de NP-PLA dans les formulations.

(A) Mesures de la taille, de l'indice de polydispersité (IP) et de la charge de surface des NP-PLA nues ou adsorbant à leur surface le peptide Rev Min ou Rev RSG à différents taux de solide de particules. En gras sont indiquées les formulations retenues suite à cette étude. (B) Variations du rendement d'adsorption (barre en bleu clair) et du taux de chargement (courbe en bleu foncé) de peptides Rev Min ou Rev RSG à la surface des NP-PLA en fonction du taux de solide des NP-PLA. Ces données sont obtenues suite au dosage indirect de la quantité de peptide résiduelle non adsorbée par dosage colorimétrique. L'adsorption des peptides a été réalisée en tampon carbonate (pH11) avec un taux fixe de NP-PLA de 1% pendant une durée de 2h.

Pour les deux peptides, nous pouvons distinguer une diminution de la taille des complexes formés, proportionnelle à l'augmentation du taux de NP-PLA. Pour les taux de NP-PLA inférieurs ou égaux à 0,5 %, même si le taux de chargement a tendance à augmenter, les tailles des complexes trop importantes et les IP élevés laissent supposer une formation d'agrégats. De la même manière, nous pouvons voir que pour des taux supérieurs ou égaux à 1,5 %, même si les IP sont satisfaisants et que le taux de chargement augmente, la taille n'a que peu, voire pas augmenté, laissant supposer

Résultats

l'absence d'adsorption sur les NP-PLA. Pour le peptide Rev Min, nous avons également exclu le taux de solide de 0,75 % qui, malgré un bon rendement d'adsorption et taux de chargement, ne rentre pas dans les critères souhaités par le laboratoire (IP de 0,328). Pour le peptide Rev RSG, aux taux de solide de 0,75 ou de 1 % de NP-PLA, l'IP et la taille des complexes sont corrects et les rendements d'adsorption et taux de chargement augmentent. Au vu des résultats et pour des raisons pratiques, nous avons sélectionné pour les deux peptides le taux de solide de 1 % de NP-PLA.

Optimisation des formulations

Suite à l'identification des deux concentrations optimales en peptides et NP-PLA, nous avons analysé la durée de réaction permettant d'obtenir les meilleures formulations. Pour cela, les différents paramètres ont été évalués au cours d'une cinétique. Durant cette dernière, peu de variations des paramètres ont été observées (**Figure 35**). Nous avons sélectionné pour les deux peptides un temps de réaction de 2h, une durée de réaction couramment employée au sein de l'équipe et ayant montré des résultats corrects.

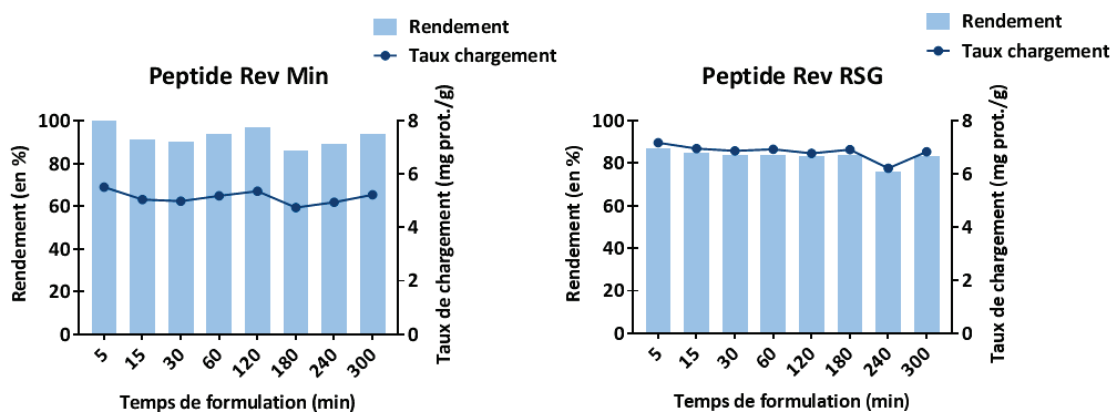


Figure 35 : Détermination de la durée optimale des formulations en tampon carbonate pH 11.

Variations du rendement d'adsorption (barre en bleu clair) et du taux de chargement (courbe en bleu foncé) de peptides Rev Min ou Rev RSG à la surface des NP-PLA en fonction du temps. Ces données sont obtenues suite au dosage indirect de la quantité de peptide résiduelle non adsorbée par dosage colorimétrique.

Les résultats précédents ont permis de montrer la possibilité d'adsorber à la surface des nanoparticules les peptides Rev tout en conservant des particules de taille homogène. Les tests de formulations ont été réalisés dans un tampon carbonate 25 mM à pH11 ayant une force ionique permettant de favoriser la stabilité colloïdale. En effet, ce tampon a un pH plus proche du point isoélectrique des peptides. Nous avons évalué la capacité de formulation dans différents tampons, tels que l'eau ou le PBS, sans résultats prometteurs ; une floculation des formulations a été effectivement rapidement observée (données non montrées). La réalisation des formulations doit ainsi nécessairement être faite dans le tampon carbonate pH11. Cependant, suite à la formation des NP, une centrifugation douce et une suspension des particules dans d'autres tampons sans modifications des paramètres est possible (données non montrées).

Résultats

Adsorption des ARNm portant la séquence RRE à la surface des complexes NP-PLA/peptide Rev

Les peptides Rev sont connus pour se lier spécifiquement aux séquences RRE des ARN viraux du VIH-1. Dans cette partie, nous avons évalué la capacité d'interaction entre les peptides Rev couplés aux NP-PLA et l'ARNm eGFP portant la séquence RRE (ARNm eGFP-RRE-40A).

Afin de faciliter les interactions entre l'ARN eGFP-RRE-40A et les peptides couplés aux NP-PLA, un changement de tampon a été réalisé. Pour cela, une centrifugation douce des complexes a été faite avant de suspendre ces derniers dans un tampon phosphate à pH6. Ce tampon permet d'augmenter la force ionique de la solution et ainsi de faciliter les interactions entre les peptides et la séquence RRE de l'ARNm. Le changement de tampon modifie légèrement la stabilité des complexes qui conservent tout de même une taille, un IP et une charge de surface proche des valeurs observées avant le changement de tampon (**Figure 36A**).

Suite à ce changement de tampon, nous avons adsorbé les ARNm porteurs de RRE sur les complexes NP-PLA/Peptide Rev à différents ratios de concentrations. Pour contrôler la spécificité de l'interaction, nous avons également réalisé ce couplage avec un ARNm eGFP dépourvu de la séquence RRE. La taille, l'IP et la charge de surface des particules formées ont été évalués. Seuls les résultats obtenus avec le peptide Rev Min sont présentés mais des résultats similaires ont été obtenus avec le peptide Rev RSG (**Figure 36B**). Tout d'abord, nous pouvons observer une faible différence entre les résultats obtenus avec l'ARN ayant la séquence RRE (ARNm eGFP-RRE-40A) et ceux obtenus avec l'ARNm eGFP contrôle. Un manque de spécificité dans l'interaction entre l'ARN et le peptide Rev semble ainsi avoir lieu. Pour l'ARNm eGFP-RRE-40A au ratio 2 :1, nous pouvons observer une taille et un IP augmenté contrairement aux autres ratios. Pour ce ratio ainsi que pour les ratios 2 :1 et 8 :1 réalisés avec l'ARNm eGFP, il est possible qu'il y ait eu complexation avec l'ARNm.

Afin de vérifier l'interaction des complexes avec les ARNm, un test de retard sur gel a été réalisé (**Figure 36C**). En cas de formation de complexe, les ARNm vont être retenus dans les puits. En revanche, si l'ARNm ne s'est pas couplé aux NP-PLA/peptides, ils vont migrer dans le gel comme l'ARNm libre. Comme précédemment, l'ARNm eGFP dépourvu de la séquence d'interaction RRE est utilisé comme contrôle de spécificité pour l'interaction avec le peptide Rev. Pour réaliser ce test, 100 ng d'ARNm ou des volumes équivalents pour les contrôles ont été déposés sur gel d'agarose. Les résultats obtenus sont similaires pour le peptide Rev Min et Rev RSG ainsi que pour les ARN eGFP-RRE-40A et eGFP quel que soit le ratio de concentration testé. Des bandes d'ARNm sont retrouvées dans les puits des ARNm complexés au niveau du champ de migration des ARNm libres. Ces bandes ont une intensité identique à celle de l'ARNm libre. Ces résultats supposent une absence d'interaction de l'ARNm aux complexes NP-PLA/peptide Rev. Pour vérifier ces données, les formulations ont été

Résultats

centrifugées et un dosage indirect des ARNm présents dans le surnageant a été réalisé. La totalité de l'ARNm inséré dans la réaction se retrouve dans le surnageant (données non montrées). Pris ensemble, ces données montrent l'absence d'interaction entre l'ARNm et les particules de PLA couvertes de peptide Rev.

Ces tests ont également été réalisés en eau et en tampon phosphate pH 6, 10 mM en absence ou supplémenté par 10 mM de NaCl et ont donné des profils similaires (Figure non montrée).

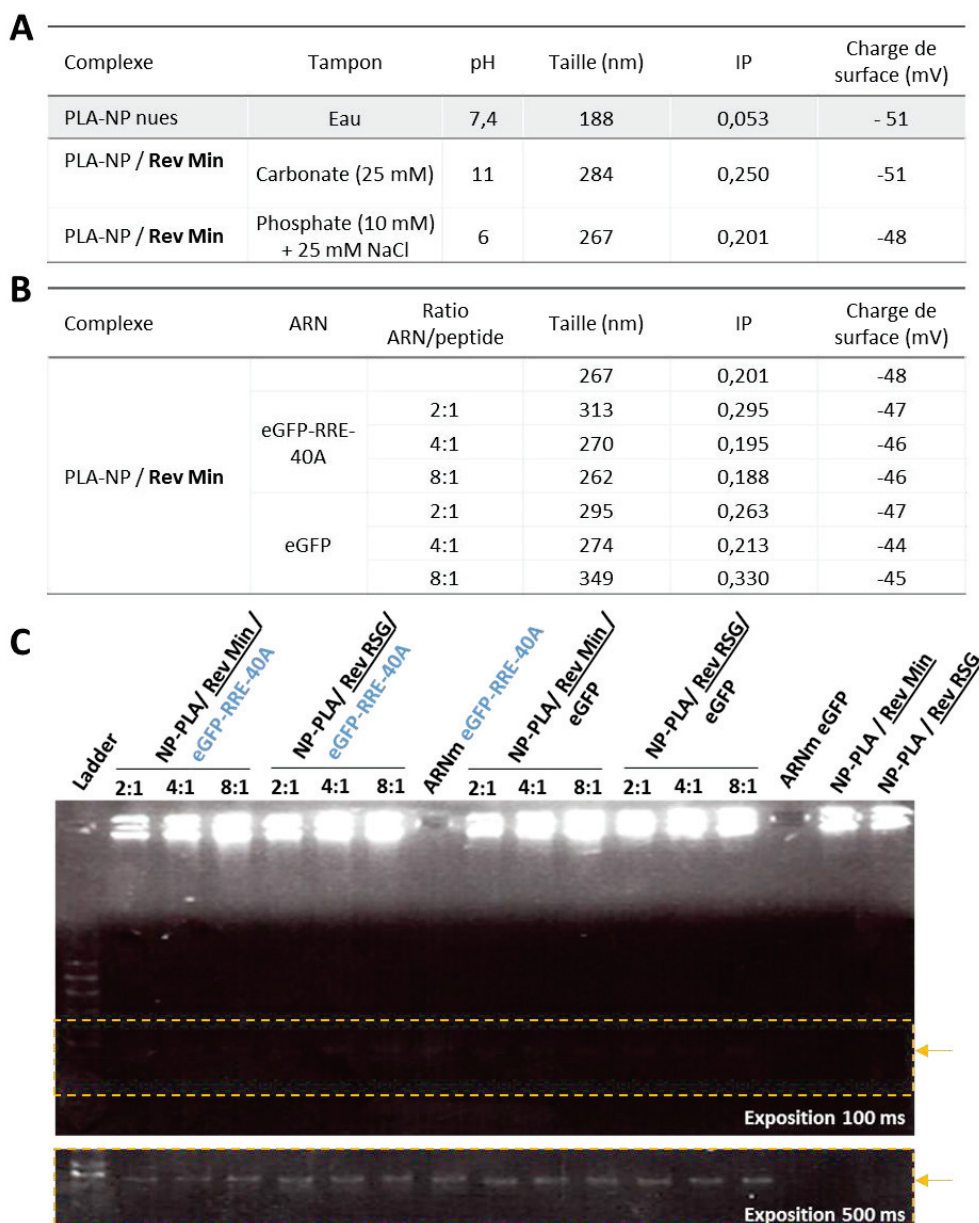


Figure 36 : Adsorption des ARNm sur les complexes NP-PLA / Peptide Rev Min.

(A) Caractérisation des NP-PLA nues contrôles, suite à la formulation du peptide Rev Min en tampon carbonate et suite à la resuspension des complexes en tampon phosphate. La taille, l'indice de polydispersité (IP) et la charge de surface des complexes ont été mesurés. (B) Mesures de la taille, de l'indice de polydispersité (IP) et de la charge de surface des NP-PLA nues contrôles ou adsorbant à leur surface le peptide Rev Min en tampon phosphate pH6 (10 mM + 25 mM de NaCl) et en présence d'ARNm eGFP-RRE-40A ou eGFP à différents ratios de concentration. (C) Gel retard montrant la migration des ARNm eGFP-RRE-40A (en bleu) et eGFP libres ou complexés aux NP-PLA/Peptide Rev Min et Rev RSG à différents ratios de concentration. Pour mieux visualiser l'ARNm (flèche), deux temps d'exposition des gels sont présentés au niveau de la zone encadrée en jaune : 100 ms et 500 ms.

Résultats

Malgré des résultats peu convaincants, nous avons transfecté ces formulations dans des cellules DC2.4, un modèle cellulaire de cellules dendritiques, et dans les cellules HEK293. Cependant, aucune fluorescence n'a été détectée même après 48h de transfection (données non montrées). Au vu des résultats obtenus et suite au manque de spécificité d'interaction et/ou au masquage du site d'interaction, nous avons décidé d'évaluer la deuxième stratégie d'interaction basée sur la formation d'un pré-complexe ARNm peptide avant la liaison au NP-PLA.

c. Adsorption du complexe peptide / ARNm sur les NP-PLA

La deuxième stratégie est basée sur l'association de l'ARNm avec un peptide Rev dans un premier temps puis à l'adsorption de ce complexe sur les NP-PLA (**Figure 37**).

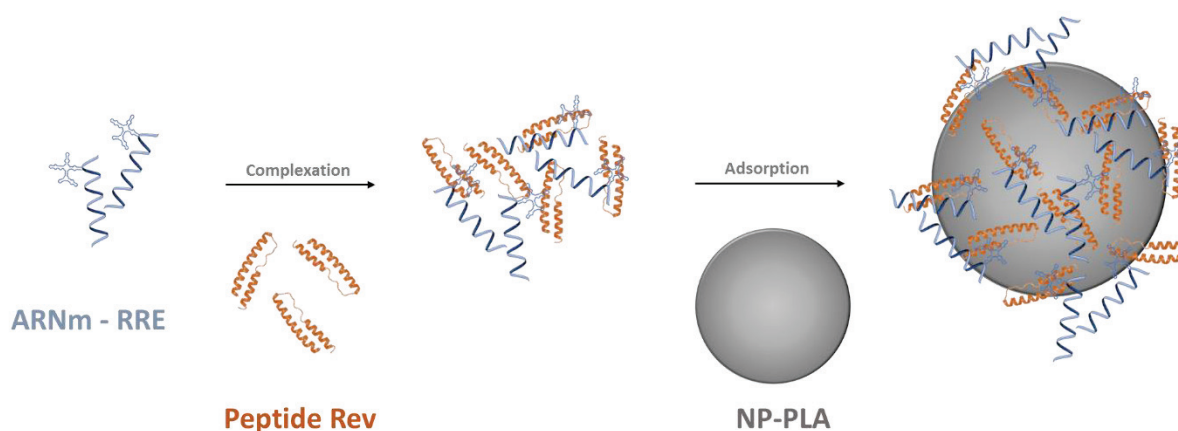


Figure 37 : Schéma de stratégie de vectorisation basée sur la formation d'un pré-complexe peptide-ARN.

Dans cette stratégie, l'ARNm portant la séquence RRE est complexé au peptide Rev. Ce pré-complexe est ensuite adsorbé à la surface des NP-PLA.

Formation des complexes entre l'ARNm RRE et les peptides Rev puis adsorption sur les NP-PLA

Dans un premier temps, nous avons cherché à former un complexe entre l'ARNm portant la séquence RRE et les peptides Rev Min et Rev RSG, deux peptides décrits pour interagir naturellement avec les séquences spécifiques RRE. Dans la littérature, il est décrit que plusieurs protéines Rev interagissent sur un ARNm RRE³³⁴. Dans le but de tester cette interaction, nous avons donc testé différents ratios peptide Rev/ARNm afin de se placer en excès de peptides. Afin de vérifier l'interaction des peptides et des ARNm, un test de retard sur gel a été réalisé. Pour cela, 100 ng d'ARNm eGFP-RRE-40A ou eGFP complexés avec les peptides Rev Min ou Rev RSG à différents ratios de peptides par ARN (1:1, 4:1, 8:1 et 12:1) ou d'ARNm libres ont été déposés sur gel d'agarose. Les résultats obtenus sont similaires pour le peptide Rev Min et Rev RSG : seules les données pour le peptide Rev Min sont présentées (**Figure 38A**). Nous avons pu remarquer que les ARNm eGFP-RRE-40A sont retenus dans le puits à partir du ratio 4:1 (Peptide:ARN), suggérant une interaction de ces deux composants. Cependant, l'ARNm eGFP dépourvu de la séquence RRE est lui aussi retenu

Résultats

par les peptides dès le ratio 1:1. Ces données suggèrent la formation de complexe entre les peptides Rev et l'ARNm RRE à partir d'un ratio de concentration de 4 :1, sans spécificité d'interaction.

Ces complexes peptides/ARNm ont été ensuite adsorbés à la surface des NP-PLA. La taille, l'IP et la charge de surface des particules formées ont été évalués. Seuls les résultats obtenus avec le peptide Rev Min sont présentés, mais des résultats similaires ont été obtenus avec le peptide Rev RSG (**Figure 38B**). Pour les trois ratios, nous pouvons remarquer une variation de la taille et de l'IP des formulations associée à une légère augmentation de la charge de surface. Les complexes ARN/Peptide Rev semblent donc être liés aux NP-PLA. Ces données ont été ensuite validées par la réalisation d'un gel retard (**Figure 38C**). Dans ce test, les complexes ont été déposés dans les puits avec ou sans traitement à l'héparine et la protéinase K. Le traitement à l'héparine permet de dissocier les complexes de la surface des NP-PLA alors que le traitement à la protéinase K permet de dégrader les peptides. En présence de ce traitement, toutes les liaisons sont altérées et l'ARNm doit migrer dans le gel comme l'ARNm libre. Nous pouvons voir qu'aux ratios 8 :1 et 12 :1, les ARNm semblent couplés aux NP-PLA. En effet, ils sont retenus dans les puits en absence de traitement et migrent dans le gel en présence d'héparine et de protéinase K.

Nous avons ainsi pu vectoriser les ARNm portant la séquence RRE sur les NP-PLA par l'intermédiaire des peptides Rev. Cependant, cette interaction semble se faire sans spécificité ; les mêmes résultats sont en effet observés pour l'ARNm eGFP dépourvu de la séquence RRE. Au vu de ces résultats encourageants, nous avons voulu vérifier la fonctionnalité des ARNm ainsi liés.

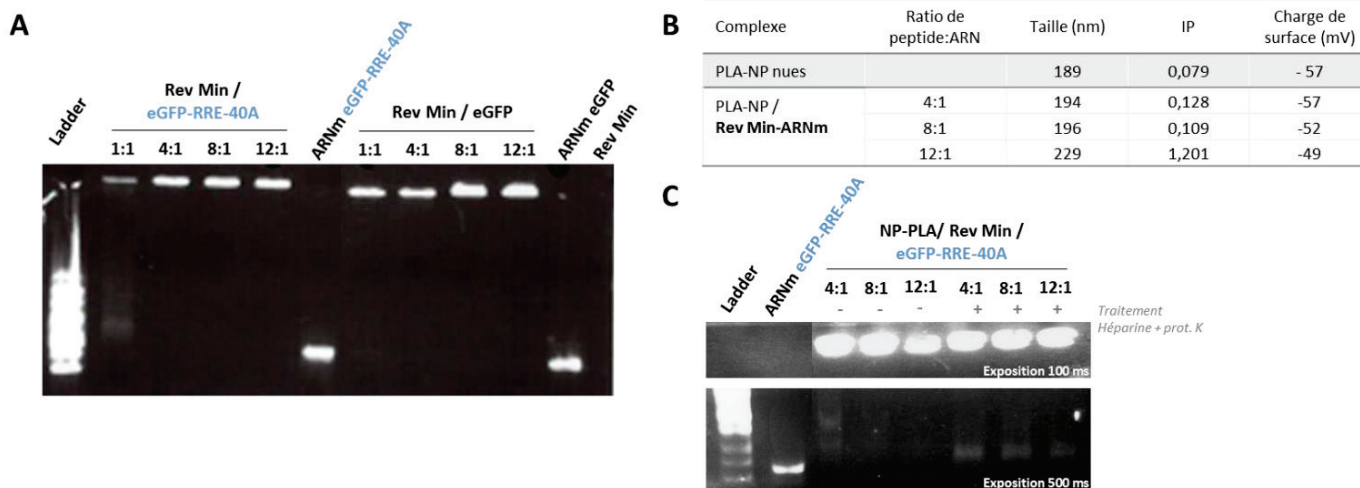


Figure 38 : Caractérisation des complexes ARN/peptide Rev libres ou liés au NP-PLA.

(A) Gel retard montrant la migration des ARNm eGFP-RRE-40A (en bleu) et eGFP libres ou complexés aux c Peptide Rev Min à différents ratios de concentrations (B) Caractérisation des NP-PLA nues contrôles ou adsorbant à leur surface des complexes Peptide RevMin/ARNm eGFP-RRE-40A à différents ratios de concentration. La taille, l'indice de polydispersité (IP) et la charge de surface des complexes ont été mesurés. (C) Gel retard montrant la migration des ARNm eGFP-RRE-40A libres ou complexés Peptide/ARNm à différents ratios de concentration. Un traitement à l'héparine et à la protéinase K a été appliqué dans certaines conditions (notées +) afin d'inhiber toutes les liaisons entre les composants. Deux temps d'exposition des gels sont présentés : 100 ms et 500 ms d'exposition afin de mieux visualiser les bandes d'ARNm.

Résultats

Fonctionnalité des formulations *in vitro* en cellules dendritiques

La fonctionnalité des formulations obtenues a été testée *in vitro* sur les cellules dendritiques DC2.4. Pour cela, les complexes ont été mis en contact des cellules pendant 4 heures en absence de sérum. La fluorescence a été analysée au microscope à fluorescence 16 heures après la transfection (**Figure 39**). La transfection de l'ARNm eGFP-RRE-40A par un agent commercial (TransIT) a été effectuée en contrôle. Nous avons pu observer qu'aucune fluorescence n'est détectée lors de la transfection des ARNm eGFP-RRE-40A complexés aux NP-PLA par l'intermédiaire du peptide RevMin. Les ARNm ainsi vectorisés ne sont pas traduits efficacement en protéines.

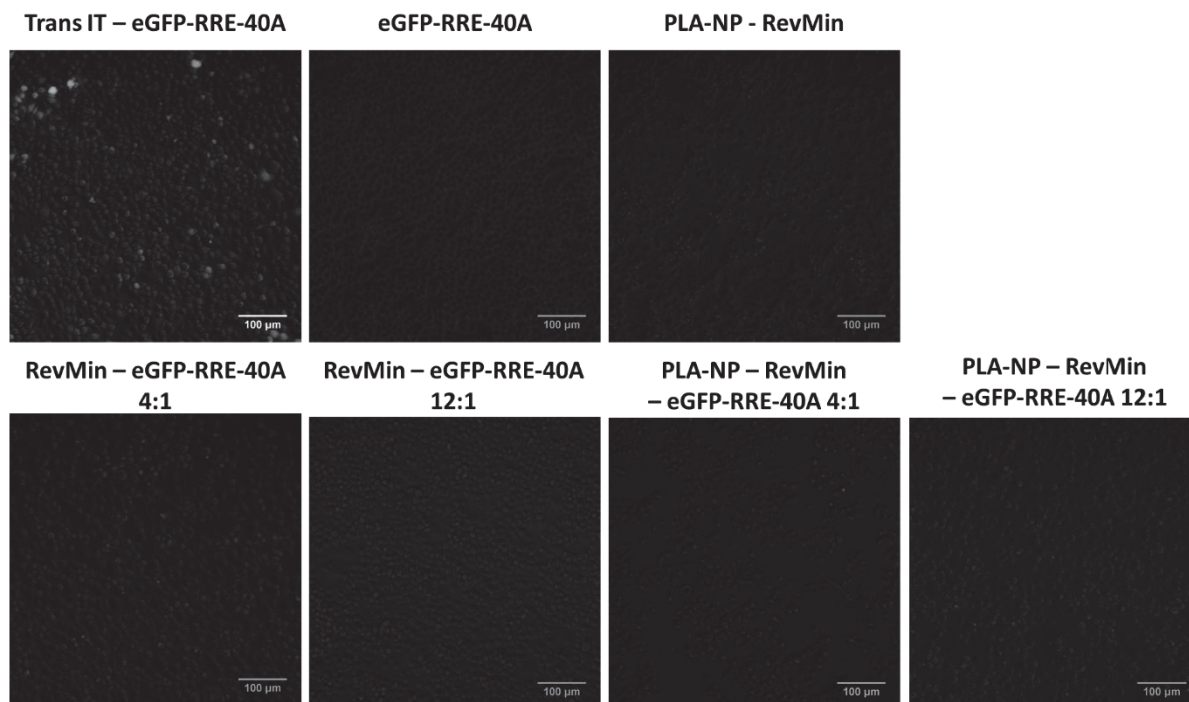


Figure 39 : Fonctionnalité des formulations dans les cellules dendritiques DC2.4.

Les cellules DC2.4 ont été transfectées avec 150 ng d'ARNm libres, vectorisés par un agent commercial (TransIT) ou complexés aux peptides Rev seuls ou en présence des NP-PLA. La fluorescence induite par l'expression de la protéine eGFP a été analysée par microscopie.

4. Discussions

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au développement d'un système de vectorisation des ARNm par les NP-PLA basé sur l'interaction naturelle entre la protéine Rev et la séquence RRE des ARN. Pour cela, nous avons développé une séquence d'ARNm couplée à la séquence d'ARNm non-codante RRE, dans laquelle il est possible d'insérer par clonage des séquences codant des antigènes d'intérêt. Nous avons pu montrer que cette stratégie ne modifie pas l'efficacité de traduction de ces ARNm en protéine.

Cette stratégie de vectorisation peut présenter de réels atouts pour la vectorisation d'un ARNm antigénique dans le cas de vaccin anti-VIH-1. En effet, la combinaison d'un peptide Rev et d'un ARNm codant pour une protéine du VIH-1 peut aboutir à une réponse immunitaire double, dirigée

Résultats

d'une part contre les peptides Rev et d'autre part contre les protéines traduites à partir de l'ARNm vectorisé. Les protéines virales Nef, Tat et Rev sont des protéines produites de manière précoce lors de la réplication du virus²⁶⁸. La protéine Rev, une fois traduite, est transloquée dans le noyau et lie les ARN non épissés et mono-épissés *via* le site spécifique RRE favorisant leur export vers le cytoplasme^{268,269}. Cette protéine est donc impliquée directement dans la production de nouveaux virions. L'induction d'une réponse anti-Rev peut permettre la lyse des cellules infectées par le VIH-1 avant la libération de nouveaux virus. En vectorisant un ARNm gag par l'intermédiaire de ce peptide, la réponse immunitaire pourrait ainsi permettre d'affecter la multiplication du virus à différents stades de sa réplication.

Dans le but de vectoriser les ARNm par les NP de PLA, nous avons mis au point une stratégie qui consiste à former un pré-complexe peptide Rev / ARN-RRE, puis à adsorber ces complexes à la surface de NP-PLA. Cependant, nous avons pu remarquer que cette interaction semble indépendante de la séquence RRE et/ou que dans nos conditions d'interaction des appariements REV-ARN aspécifiques se produisent. En effet, un ARNm dépourvu de la séquence RRE a une capacité à se lier aux peptides semblable à celle des ARNm-RRE. Afin de vérifier la spécificité d'interaction, nous pourrions réaliser les formulations en présence d'ARN de transfert qui satureront les appariements aspécifiques. En revanche, nous pouvons noter que les séquences riches en arginine, comme c'est le cas des peptides Rev utilisés, semblent efficaces pour permettre la liaison d'acides nucléiques. Ces données ont été vérifiées dans une étude récente de vectorisation d'ARNm¹⁴⁹. En effet, les auteurs ont montré la possibilité de former des complexes entre un peptide riche en arginine (RALA) et un ARNm ayant la capacité d'activer les réponses immunitaires T *in vivo*.

Dans cette étude, nous avons pu remarquer que malgré la fonctionnalité des ARNm portant la séquence RRE, ces derniers ne sont pas traduits efficacement *in vitro* lorsqu'ils sont complexés aux peptides et/ou aux peptides/NP-PLA. L'absence d'expression en cellule peut être induite par un dysfonctionnement à plusieurs niveaux. Tout d'abord, nous pouvons nous demander si les NP ainsi formulées sont correctement prises en charge par les cellules et notamment par les cellules dendritiques. Afin de répondre à cette problématique, nous avons réalisé des tests de formulation avec des NP encapsulant un fluorophore rouge (BodiPy Rouge) à l'intérieur. Nous avons alors observé que la présence des peptides de surface n'altère pas le mécanisme d'endocytose des particules (données non montrées). L'absence d'expression semble donc venir d'un dysfonctionnement intracellulaire. Les ARNm ainsi complexés peuvent ne pas être libérés correctement dans le cytoplasme des cellules. Si les complexes sont endocytosés, il est possible que ces derniers restent bloqués dans les endosomes. Pour évaluer cette hypothèse, nous pourrions réaliser un test d'hémolyse des globules rouges à divers pH en présence de ces formulations. Cette technique consiste à mettre en contact les formulations

Résultats

avec des globules rouges resuspendus dans des tampons à différents pH, mimant les variations de pH dans les endosomes. Si les formulations ont une capacité d'échappement des endosomes, ils vont induire une rupture des membranes des globules rouges à pH acides, comme dans le cas du mécanisme d'éponge à protons¹¹². La lyse des globules rouges traduira la capacité d'échappement des endosomes³³⁵. Cet échappement des endosomes est essentiel dans le cas de vaccins à ARNm. En effet, il permet un relargage dans le cytoplasme des ARNm nécessaire à leur traduction. Enfin, nous pouvons également supposer que l'absence de traduction peut être induite par une altération du mécanisme de traduction lui-même. Les complexes formés peuvent en effet empêcher l'accès des facteurs de traduction et des ribosomes. Un encombrement stérique des sites de recrutement des facteurs de traduction peut avoir lieu suite à la complexation des ARNm avec les peptides et/ou les NP-PLA. Une modification des conditions expérimentales, et notamment des tampons, pourrait être envisagée afin d'influer sur ce paramètre.

Pour conclure, une analyse plus approfondie de ces dysfonctionnements pourrait nous permettre de mieux comprendre l'absence d'expression des ARNm ainsi vectorisés et d'optimiser cette stratégie. Il faudrait également réaliser des tests de cytotoxicité sur cellules. En effet, lors de la transfection, nous avons remarqué une augmentation de la mortalité des cellules en contact de nos formulations. Cette toxicité, absente des contrôles contenant les NP-PLA, les ARNm ou et les peptides seuls suspendus en eau, peut être induite par les tampons de formulations.

Au vu des résultats et de la complexité d'optimisation de cette stratégie, nous avons préféré nous focaliser sur une autre approche de vectorisation. Cette stratégie n'a pas été retenue pour vectoriser les ARNm antigéniques dans ce projet.

3. Adsorption *via* des protéines et peptides cationiques

Les deux premières stratégies testées n'ont pas permis d'identifier une méthode efficace pour vectoriser les ARNm par les NP-PLA. Les ARNm sont des biomolécules chargées négativement tout comme la surface des nanoparticules de poly(acide lactique) (NP-PLA) développées au sein du laboratoire. Dans cette troisième partie, une stratégie basée sur l'adsorption des ARNm à leur surface par utilisation d'intermédiaires cationiques a été évaluée. Nous avons testé une stratégie de vectorisation basée sur l'ajout des composants en couche par couche : l'intermédiaire cationique a tout d'abord été adsorbé à la surface des NP-PLA, puis les ARNm ont été adsorbés à la surface des NP-PLA couplées à l'intermédiaire.

Pour cela, nous avons sélectionné différents intermédiaires cationiques décrits pour la vectorisation d'acides nucléiques (ADN, siARN ou ARNm)^{52,148,336,337}. Nous avons ainsi testé au sein du laboratoire les dendrimères de poly-L-lysine (DGL), la poly-L-lysine, la protamine, et trois peptides ayant une capacité pénétrante (CPP pour *cell-penetrating peptide*) : les peptides LAH4, LAH4-L1 et RALA. Pour chaque intermédiaire, nous avons déterminé les quantités optimales de chacun des composants (intermédiaire cationique, NP-PLA et ARNm) permettant d'obtenir des formulations stables et homogènes. La fonctionnalité des ARNm complexés sur ces vecteurs a ensuite été vérifiée par réalisation d'injections directes dans l'embryon de poisson zèbre *in vivo*. Enfin, la capacité de transfection de ces nanocomplexes a été testée dans des modèles de cellules *in vitro*.

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence une stratégie permettant la vectorisation des ARNm à la surface des NP-PLA par utilisation de poly-L-lysine (PLL) et de dendrimères de poly-L-Lysine (DGL)³³⁶⁻³³⁸. Des tests de formulations nous ont permis de mettre en évidence les quantités optimales de chaque composant pour obtenir des vecteurs stables. Suite à des administrations directes dans les embryons de poisson zèbres au stade une cellule, nous avons pu voir que la complexation des ARNm à la surface des NP-PLA par utilisation de ces deux intermédiaires n'altérerait pas la fonctionnalité de ces derniers. Cependant, la forte toxicité des formulations comprenant les DGL nous a conduit à poursuivre les études uniquement avec les formulations à base de PLL. Dans une dernière analyse, la capacité de transfection des complexes NP-PLA/PLL/ARNm a été évaluée dans un modèle de cellule dendritique (les SRDC). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir une transfection efficace de manière significative dans ces cellules.

Dans la suite du projet, nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation de la protamine comme intermédiaire. Cette protéine connue pour ses capacités de condensation des acides nucléiques est utilisée dans de nombreuses études actuelles pour la vectorisation d'ARNm^{52,188}. Dans ce travail, nous avons réussi à adsorber la protamine à la surface des NP-PLA, puis à ajouter les ARNm à la

Résultats

surface de ces complexes. Cependant, nous avons obtenu de très faibles taux d'adsorption des ARNm et la fonctionnalité de ces derniers n'a pas été maintenue. De plus, suite à la transfection des nanocomplexes dans les cellules *in vitro*, aucune expression de l'ARNm n'a été détectée. Les ARNm ainsi vectorisés ne sont donc pas fonctionnels et ne permettent pas de transférer efficacement les cellules.

Dans une dernière partie, nous nous sommes ainsi intéressés à l'utilisation de petits peptides ayant des capacités de pénétration dans les cellules : les peptides RALA, LAH4 et LAH4-L1^{149,339,340}. Par la même stratégie, nous n'avons pas réussi à adsorber les ARNm à la surface des NP-PLA. Au vu des travaux de bibliographie, nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation d'une deuxième stratégie de vectorisation basée sur (1) la formation d'un pré-complexe entre le peptide et l'ARNm, puis (2) son adsorption à la surface des NP-PLA. Par cette deuxième stratégie, nous avons montré qu'il était possible de vectoriser les ARNm à la surface des NP-PLA afin d'obtenir des vecteurs stables et monodisperses. Bien que les tests de fonctionnalité dans les embryons de poisson zèbres n'aient montré qu'une faible expression, ces formulations ont efficacement transfecté les cellules HEK293 et les DC2.4.

Cette capacité à transférer les DC2.4, un modèle de cellules dendritiques, font de ces vecteurs une plateforme prometteuse pour la délivrance d'ARNm.

Ces travaux ont été réalisés au cours des 4 dernières années au sein du laboratoire. L'évaluation de cette stratégie fait l'objet d'une publication en cours de rédaction en co-auteur avec Céline Lacroix. Les résultats de cette publication sont insérés dans le corps du texte ci-dessous et la publication est en cours de corrections.

Comparison of different Strategies to vectorize mRNA onto Poly(lactic acid) nanoparticles using cationic intermediates

Anne-Line Coolen*, Céline Lacroix*, Laetitia Vachez, Céline Coiffier, Perrine Mercier-Gouy, Gwenaëlle Humbert, Charlotte Primard, Emilie Delaune, Jean-Yves Exposito, Bernard Verrier
Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, Université Lyon 1, CNRS, IBCP – Lyon, France

* These authors contributed equally to this work.

Correspondence: bernard.verrier@ibcp.fr

Abstract

Messenger RNA-based platform currently raises a growing interest in vaccinology but several challenges remain to overcome. Among them, efficient delivery of antigen-coding mRNA into the cytosol of immune cells is needed to induce antigen production and to trigger a broad spectrum-immune response. Actually, major delivery systems for mRNAs were based on lipid nanoparticles. In this study, we developed an alternative strategy to lipid formulations using poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) as carrier. Because mRNA and PLA-NPs are both negatively charged, their association require the addition of cationic intermediates. To that end, we compared poly-L-lysine, dendrigraft of poly-L-lysine, protamine and three cell-penetrating peptides (RALA, LAH4 and LAH4-L1) as cationic intermediates. We designed and optimized strategies to obtain stable and homogeneous colloidal nanocomplex formulations. For each strategy, the functionality of mRNA was verified on 1-cell stage zebrafish eggs and each transfection efficiency was evaluated *in vitro* in cell models. Ribonucleic acid platforms based on (1) the formation of precomplexes by condensing mRNA with LAH4 and LAH4-L1 and (2) adsorption of those precomplexes onto PLA-NPs seem to be the best promising. In fact, those formulations are stable, present a polydispersity index close to 0.1 and have the capacity to transfect cells and to influence mRNA expression. Thus, LAH4- and LAH4-L1-based formulations represent a promising platform to vectorize mRNA for vaccine development.

Keywords: mRNA-vaccine, Nanoparticles, Poly(Lactic Acid), formulation, cationic intermediate

1. Introduction

Vaccination is one of the major successes in medicine and has been essential for successfully fighting against a large number of diseases². Although generally very efficient, traditional vaccines based on attenuated or inactivated pathogens present a low infectious risk, which makes them not applicable for a number of infectious pathogens³⁴¹. To reduce the infection risk, sub-unit and recombinant protein vaccines have been developed. However, to circumvent the low immunogenicity of these vaccines, adjuvants are needed, such as immunostimulatory molecules, or new vectorization systems to enhance their efficiency.

mRNA-based delivery approaches have emerged as highly promising in vaccinology and their development currently receives much attention²³. These strategies aim at introducing effectively stable *in vitro* transcribed (IVT) mRNAs encoding antigenic proteins into the cytosol of target cells, and to induce an adequate immune response. mRNA-based medicament presents key benefits for vaccine development. First, and contrary to proteins, proof-of-concept of a mRNA formulation can be easily adapted for the fast development of a variety of new vaccines. Second, compared to DNA, mRNAs do not integrate into the host genome, minimizing the potential risks of insertional mutagenesis. Third, mRNAs do not need to cross the nuclear envelop for their expression, increasing their ability to transfect non-dividing and hard-to-transfect cells such as cells relevant for the immune response. Finally, IVT mRNA chemical modifications and the development of sequences increasing mRNA stability have potentiated their vaccine efficiency³⁵.

Targeting dendritic cells (DCs) is often the goal of mRNA vaccine strategies, as these major antigen presenting cells (APCs) play central roles in inducing and orchestrating immune responses^{244,342}. Hence, DCs might translate mRNA into antigens, process these proteins for presentation on the Major Histocompatibility Complex type I (MHC-I) and/or II (MHC-II), and activate the cytotoxic and humoral arms of the adaptive immune response³. The potential for inducing a cytotoxic response is indeed a great advantage of such approaches, for fighting against diseases such as cancer or HIV^{23,55,118,343}. In addition, DCs express PRRs (Pattern Recognition Receptors) such as, innate immunity receptors able to recognize RNAs in the cytosol or endosomes and activate the DCs for initiation of the immune response^{4,40}. Thus, mRNA present a self-adjuvant effect, that, if balanced, can contribute to activate DCs¹⁵⁷. Altogether, these advantages make mRNAs highly promising biomolecules for new vaccine therapies or protections.

Despite advantages, key challenge associated with the use of mRNAs is their delivery to DCs. In fact, mRNAs are polyanionic molecules, which in naked format has great difficulty to cross nonpolar cellular barriers to reach the cytosol compartment. Moreover, mRNAs are susceptible to

Résultats

rapid degradation by nucleases and must be protected during the delivery. Although important advances have been made to improve the stability and functionality of mRNAs^{169,344}, a major hurdle for using mRNAs remains to identify efficient delivery systems. Various delivery complexes originally developed for DNA and siRNA have been used for mRNA transfection. According to their chemical composition and organization, these vectors can protect mRNA from degradation, favor their cellular uptake and/or endosomal escape¹⁸². Actually, lipid nanoparticles (LNP) are the most attractive platform for mRNA delivery^{24,32,165–167}. In fact, although very encouraging results have been obtained with them in preclinical and clinical studies^{82,166,193}, the need to optimize their delivery in DCs remains high in the vaccine field.

Our group has developed a series of vaccine vectors based on nanoparticles (NP) of poly(lactic acid) (PLA), a biodegradable and biocompatible polymer. PLA-NPs have the ability to co-vectorize antigens and/or immunostimulatory molecules, which are either encapsulated or adsorbed, depending on their chemical properties^{186,255,260,345}. PLA-NPs have shown promising results to induce immune responses against several model antigens after parenteral administration in mice and non-human primates^{186,260,319}. Importantly, PLA-NPs are efficiently taken up by DC *in vitro* and *in vivo*^{256,260,263}. Thus, PLA-NPs constitute promising platforms for *in vivo* delivery of mRNAs to DCs.

In this study, we have tested various methods to vectorize mRNAs into PLA-NPs. PLA-NPs and mRNAs being negatively charged, we have evaluated the capacity of several cationic molecules (dendritic poly(L-lysines) (DGL), poly-L-lysine, protamine and the cell penetrating peptides (CPPs) RALA, LAH4 and LAH4-L1) to adsorb mRNAs onto PLA-NPs, those positively charged intermediates having an efficient capacity to transfect DNA or siRNA^{336,337,339}. For the most promising formulations, we have tested their functionality and their efficiency either by *in vitro* transfection of DCs or by cytosolic injection in zebrafish eggs. Among them, the most promising strategy consists of a two steps process, with first the formation of precomplexes by condensing mRNA with LAH4 or LAH4-L1, and then the adsorption of those precomplexes onto PLA-NPs. Those formulations are stable and homogeneous and present a great ability to transfect cells and to promote mRNA translation, and are a promising tool in the fields of vaccine development.

2. Materials and methods

a. Production of *in vitro* transcribed mRNA

mCherry and eGFP mRNA were produced by *in vitro* transcription using pCS-memb-mCherry or pcDNA3-eGFP (Addgene), respectively. The plasmids were linearized with *Not I* or *Xba I* restriction enzyme (NEB), purified using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, France), and used as DNA templates for *in vitro* transcription. Capped mRNA transcripts (IVT) were produced using the Sp6 MessageMachine Kit or T7 MessageMachine Kit (Ambion, Life technologies, France) for mCherry and eGFP, respectively. mRNA purification was performed by DNase I digestion, followed phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction (Amresco) and ethanol (or LiCl) precipitated mRNAs were solubilized in RNase-free water, according to the manufacturer's instructions.

Optimized eGFP mRNA encoding green fluorescent protein was provided by Trilink or a gift from Dr Guido Vanham (University of Antwerp, Antwerp, Belgium).

RNA samples were quantified by spectrophotometric analysis at 260 nm and analyzed by standard agarose gel electrophoresis to confirm their integrity. All mRNA were stored in RNase free water at -80°C .

b. Cationic intermediates

Poly-L-Lysine (PLL) containing 30 or 100 lysine residues and Protamine were purchased from Almanda polymers and Sigma (P4020), respectively. Dendri-Graft Poly-Lysine (DGL) generation 3 (123 groups) was provided by COLCOM. The three cationic penetrating peptides (GeneScript (China)) used in this project are: RALA (N-WEARLARALARALARHLARALARALRACEA-C), LAH4 (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) and LAH4-L1 (KKALLAHALHLLALLALHLAHALKKA).

c. Nanocomplexes preparation

To form nanocomplexes using a layer-by-layer process, cationic intermediates were dissolved in RNase free-water at various concentrations. Then, equal volumes of positively charged molecule and PLA-NP (0.25 to 1.5 %, Adjuvatis, France) were mixed. After 30 min incubation at RT, equal volumes of cationic PLA-NP/Peptide complexes and mRNA (at different concentrations) solutions were mixed in RNase-free water and the final nanocomplexes were incubated 1 h at RT.

Résultats

Another approach was to mix first an equal volume of mRNA and cell penetrating peptide (RALA, LAH4-L1 or LAH4) solutions, and then to add V/V these two component complexes with PLA-NP.

d. Nanocomplexes characterization

The hydrodynamic diameter and zeta potential (surface charge) of the mRNA complexes were determined by dynamic light scattering (DLS) using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, U.K.).

Adsorption efficiency and loading rate were determined by indirect quantification of non-adsorbed component. Non-adsorbed cationic intermediates were quantified by μ BCA (Thermo Scientific) in the supernatant of PLA-NP/Intermediate complexes after two successive centrifugations (10000g, 10 min). The same experimental procedure was realized to quantify non-adsorbed mRNA by spectrophotometric analysis at 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

For electrophoretic mobility shift assay (ESMA), 200 ng mRNA samples were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel with 1 X TBE buffer (Euromedex, France) in presence of BET (Genesee Scientific). A treatment with heparin and proteinase K was performed in order to separate mRNA from complexes. Briefly, complexes were successively treated with heparin (Sigma) during 30 min at RT and with proteinase K (NEB) at 56°C during 30 min.

e. In vitro expression in cell lines

SRDC cell line (immortalized mouse spleen dendritic cells³⁴⁶), was propagated in complete IMDM medium (Gibco, Life Technologies, France) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco) at 37° and 5% CO₂. Immortalized DC2.4 cell line (a murine bone marrow derived dendritic cell line³³²) was cultured in complete RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 mM Hepes and 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco) at 37° and 5% CO₂. HEK293 cells (ATCC[®] CRL-1573[™]) were cultured in DMEM containing 10% heat-inactivated FBS (Gibco) at 37°C and 5% CO₂.

For PLL-based formulation efficiency analyses, cells were seeded in a 12-well plate at the density of 350 000 cells/wells in 1 mL of complete medium. After 24h of culture, formulations (equivalent to 500 ng of mCherry mRNA) or an equal volume for controls were added to cells. Then, cells were incubated at 37° and 5% CO₂ for 24 h. Positive transfection control was performed with Lipofectamine[™]-2000 Transfection Reagent (ThermoFischer Scientific) using the manufacturer's recommendations. Negative controls were performed with the supernatant of nanocomplexes obtained after two successive centrifugations (10000g, 10 min) and supplemented with 500 ng of

Résultats

naked mRNA. To quantify the number of fluorescent-positive cells and MFI, transfected DCs were harvested, stained with propidium iodide (Invitrogen) to exclude dead cells and analyzed by LSRII flow cytometer (BD Biosciences) on the AniRA cytometry facility (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). Living DCs were gated based on their large forward (FSC) and large side scatter (SSC) profile to exclude cell debris. SRDC viability after transfection is up to 80%. Data analysis was performed with FlowJo Software (Tree Star).

For cationic peptide-based formulation assays, cells were seeded in a 48-well plate at the density of 40 000 cells per well. After 24 h of culture, complete medium was replaced by 250 μ L of serum-free medium, and formulations (equivalent to 50 ng of eGFP mRNA) or a equal volume for controls were added to cells. Four hours after transfection, supernatants were removed and 250 μ L of complete medium was added. Then, cells were incubated until the analysis at 37°C and 5% CO₂ for 18 h. Cells were imaged by fluorescence microscopy using the Eclipse Ti-E microscope (Nikon) on the platform PRIMATISS (SFR BioSciences, UMS3444/CNRS).

f. In vitro cytotoxicity analysis

SRDC cells were seeded in a 96-well plate at the density of 20 000 cells/wells in 100 μ L of complete medium. After 24h, formulations (including 500 ng of mCherry mRNA) or equivalent volume for controls were added to cells. After incubation at 37° and 5% CO₂ for 24 h, 10 μ L of Cell Counting Kit-8 reagent (Dojindo) was added in each well and plate was incubated for 2 h. Sample absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Bio-Rad). Absorbance was determined as the mean three independent experiments, each of which includes three replicates.

g. Functionality and cytotoxicity analysis in zebra fish embryo

Experiments were performed on fresh eggs of zebrafish (*Danio rerio*) collected from wild-type AB/Tubingen or casper lines³⁴⁷. All microinjections were performed into one cell stage embryos before division using a micro-injector Eppendorf FemtoJet on the platform PRECI (SFR BioSciences, UMS3444/CNRS). The injection volume is of 1 nl. Formulations prepared as previously described were injected at a final dose of 20 pg of mRNA per egg. Living embryos were observed 24 hpi using a Nikon TiE microscope with FITC filter. To allow a comparative-like study, same microscopic parameters were applied for all images.

h. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6.0 software. All of the data are presented as the mean \pm SEM. Difference between groups was analyzed as described in figure legends. Statistical significances were indicated on the figures.

3. Results

a. Vectorization of mRNA onto PLA-NP using poly-L-lysine and DGL

Poly-L-lysine (PLL) is one of the first cationic polymers that have been ever used for gene transfer. This polycation carrier is able to condensate negatively charged nucleic acids into soluble polyplexes³⁴⁸. Moreover, this intermediate presents a low toxicity in comparison to other cationic peptides¹⁵⁹. The size of PLL polymers can affect their interactions with nucleic acids, forming either soluble complexes or aggregates. Accordingly, we have chosen to test two linear PLL polymers made of 30 (PLL30) or 100 (PLL100) lysine residues, and one dendritic PLL derivative (dendrigraft) of the 3rd generation, called DGL³³⁷.

To adsorb mRNAs onto PLA-NPs using PLLs and DGL, a two-step process was applied. The cationic PLLs or DGL were first adsorbed onto the negatively charged surface of PLA-NPs and, mRNAs were then added onto these complexes to form nanocomplexes (**Figure 40A**). The concentration of each component was optimized to avoid the formation of aggregates leading to unstable colloidal formulations (Figure 1 and data not shown). First, the PLA-NP optimal rate was determined using a fixed concentration of PLL (100 µg/mL) (**Figure 40B**). After formulation, the nanocomplexes were pelleted by centrifugation and the residual PLL in the supernatant was quantified to measure the adsorption efficiency and the loading capacity of PLL onto PLA-NPs. In theory, this two values evolve in opposite manner, the adsorption efficiency increasing with the PLA-NP rate and the available surface, and the loading rate decreases³³³. Optimal PLA-NP rate will correspond to a compromise between these two parameters. As expected, the adsorption efficiency increased with PLA-NP rate (in dark blue) while the loading rate (in light blue) decreased. PLA-NPs presented a lower ability to adsorb PLL30 than PLL100. Thus, we chose to use PLL100 for the next analyses. A maximal PLL100 loading rate was obtained with 0.25 and 0.5 wt% PLA-NPs. However, due to a higher adsorption efficiency, we chose to perform the following formulations using 0.5% PLA-NPs.

Next, the optimal amount of PLL to be adsorbed onto 0.5% PLA-NPs was determined, by constructing a Hesselink isotherm, which represents the loading rate as a function of the residual PLL in the supernatant (**Figure 40C**). When the PLA-NP surface is fully covered, the loading rate reaches a plateau and the increase of PLL only induce an increase of residual PLL. A PLL amount of 50 µg/mL represented the best balance between high loading rate and low residual PLL.

Last, we optimized the amount of mRNAs to be adsorbed onto PLA-NP/PLL surface. As shown in **Figure 40D**, an optimal adsorption efficiency was obtained with 20 ng/µL of mRNA, with

Résultats

71.75% of adsorption onto PLA-NP/PLL complexes. A lower mRNA concentration resulted in a decrease of the adsorption efficiency, while higher concentration led to the formation of aggregates.

Similarly, the optimal experimental conditions were determined for DGL-based formulations, and the most effective composition corresponds to 1% PLA-NP, 250 $\mu\text{g/mL}$ of DGL and 40 $\mu\text{g/mL}$ of mRNA.

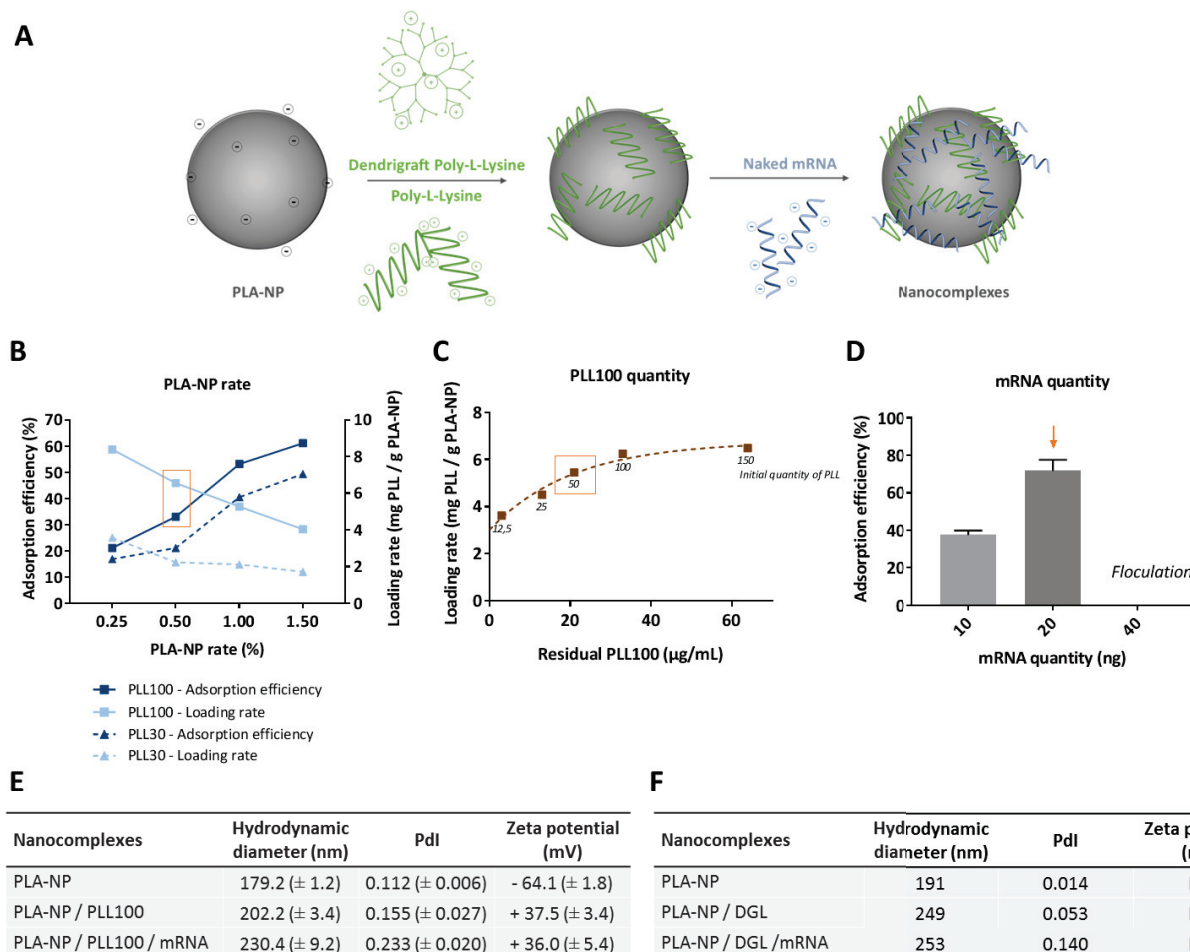


Figure 40: mRNA adsorption onto PLA-NP through Poly-L-Lysine₃₀ or 100 and DLG.

(A) Schematic representation of the vectorization strategy of mRNAs by PLA-NPs using poly-L-lysine (PLL) or dendrigraft of poly-L-lysine (DGL). Positively charged PLL or DGL were first adsorbed onto negatively charged surface of PLA-NPs and then, mRNA was adsorbed onto these complexes to form nanocomplexes. (B) Determination of optimal PLA-NP rate using 100 $\mu\text{g/mL}$ of PLL100 or 30. Dark blue: adsorption efficiency; Light blue: loading rate for PLL100 (full line) and PLL30 (dashed line). The chosen concentration is framed by an open box. (C) Determination of optimal PLL100 concentration. Different concentrations of PLL100 were adsorbed onto 0.5% PLA-NPs. The adsorption efficiency was represented as a function of residual PLL100. Initial PLL100 concentrations used for each condition is noted on the graph in italic. The chosen concentration is framed by an open box. (D) Determination of optimal mRNA concentration. Three mRNA quantities were adsorbed onto optimized PLA-NP/PLL100 complexes. The adsorption efficiency was determined by non-adsorbed mRNA quantification. The chosen optimal concentration is shown by an arrow. (E) Comparison of thermodynamic diameter, polydispersity index (PdI) and zeta potential of PLA-NPs, naked or coated with PLL100 or with PLL100 and mRNA. Each value provided is the average of four series of measurements in each independent experiment ($N=3$). (F) Comparison of thermodynamic diameter and polydispersity index (PdI) of PLA-NPs, naked or coated with DGL or with DGL and mRNA. Each value provided is the average of four series of measurements in one experiment.

Résultats

The hydrodynamic diameter and zeta potential of nanocomplexes were analyzed by dynamic light scattering (DLS) for PLL100 (**Figure 40E**) and DGL-based formulations (**Figure 40F**). The addition of PLL100 onto blank PLA-NPs (~ 180 nm; - 64 mV) induced an increase in size and an inversion of the zeta potential (202.2 nm; + 37.5 mV). The addition of mRNAs resulted in an increase in nanocomplexes size (230.4 nm) without significant zeta potential modification (+ 36.0 mV). Similar results were obtained for the size of DGL-based nanocomplexes. Noteworthy, the polydispersity index (PDI) remains low reflecting that nanocomplexes were homogeneous in size.

Altogether, these results have shown the ability to form stable nanocomplexes between mRNAs and PLA-NPs using PLL100 or DGL.

To test the functionality of the complexed mRNAs, these formulations were microinjected into zebrafish embryos at the one-cell stage. In this model, equivalent concentrations of naked or complexed mCherry mRNAs were directly injected into the cytosol of zebrafish cells and mCherry expression was evaluated 24 h later (**Figure 41A and B**). As expected, 76 to 100% of injected embryos with naked mRNAs expressed mCherry. Moreover, with PLL-based formulations 90% of embryos showed a comparable mCherry expression, indicating that the complexed mRNA retained its full functionality. However, only 19% of embryos expressed mCherry after DGL-based injection, suggesting that mRNA may be altered or less accessible to the translation machinery in these formulations compared to PLL-based complexes. Moreover, whereas PLL-based or naked mRNA injections do not affect the viability of embryos (96% at 24 h post-injection, **Figure 41C**), DGL-based formulations induced an important decrease of viability (77% and 50% of living embryos with PLA-NP/DGL/mRNA and PLA-NP/DGL, respectively) (**Figure 41D**) with occasional developmental defects (data not shown). Thus, DGL-based formulations did not allow efficient mRNA expression, and displayed toxicity in zebrafish embryos. Thus, we focused on PLL-based formulations for the following analysis.

The ability of PLL-based nanocomplexes to transfect dendritic cells was evaluated *in vitro* using a mouse SRDC cell line as model (**Figure 41E**). To that end, PLL-based nanocomplexes containing 500 ng of mCherry mRNA were added to SRDC cells cultured in complete medium. The percentage of GFP positive cells was measured by flow cytometry 24 h later. As positive control, the same amount of naked mRNA was transfected using the commercial Lipofectamine™ 2000 reagent (ThermoFischer Scientific). For negative control, we transfected an equal volume of nanocomplex supernatant supplemented with 500 ng of naked mRNA. In presence of Lipofectamine mRNA, we observed that 20.14% of SRDC cells are mCherry positive. However, after PLA-NP/PLL100/mRNA transfection a non significant percentage (5.4%) of SRDC cells expressing mCherry was observed. In fact, we obtained a mCherry expression in only one experiment indicating a lack of transfection

Résultats

reproducibility. Moreover, this low quantity of mCherry positive cells was associated with a decrease of cell viability reflecting a low cytotoxicity effect of formulations (**Figure 41F**).

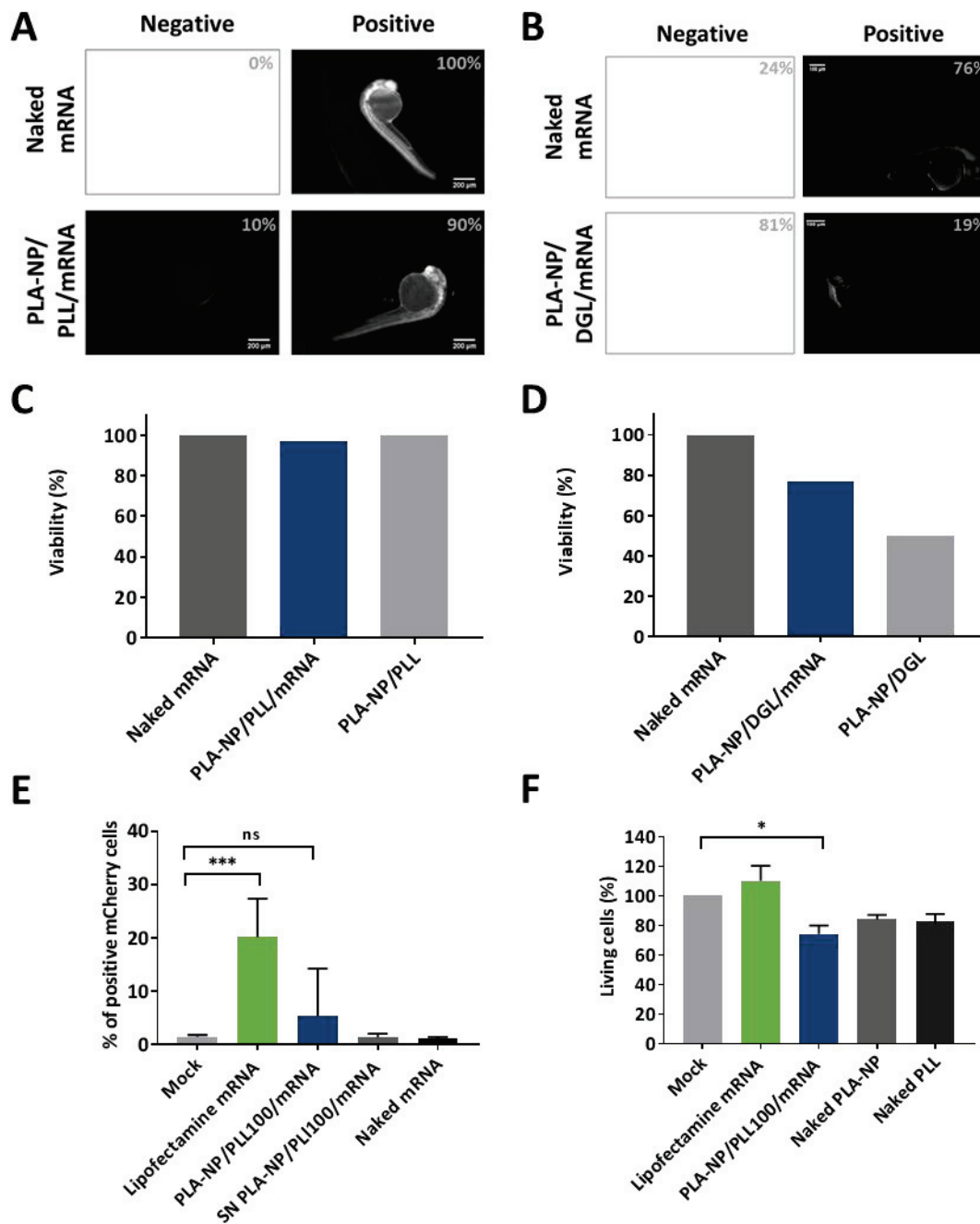


Figure 41: mRNA expression in zebra fish embryos and in mouse dendritic SRDC cells through PLL- and DGL-based complexes.

(A-B) mCherry expression in 24 hpf embryos following 1-cell-stage injection by poly-L-lysine (PLL) (A) or dendrigraft poly-L-lysine (DGL)-based formulations (B). Percentage of positive embryos in each condition was indicated. (C-D) Percentage of viability of embryos at 24 h post-injection with PLL (C) or DGL-based formulations (D). Values were obtained as the mean of 30 embryos (N=1). (E) Percentage of mCherry positive SRDC cells was measured 24 h after the addition of Lipofectamine mCherry mRNA (positive control), mCherry mRNA complexes and negative controls (supernatant of formulation (SN) plus naked mRNA) (N=4). Untreated SRDC (Mock), were transfected for 24 h (500 ng mRNA/well). Mock sample represents untreated SRDC cells). (F) Cytotoxicity of formulations was analyzed by CCK8 assay. Percentage of living cells transfected by formulations was compared to untreated cells (Mock). Statistical significance of differences was determined using one-way Anova or student t-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Résultats

To conclude, despite the reproductibility and the homogeneous size of mRNA/PLL/PLA-NP formulations, and their translational functionality into zebrafish fertilized eggs, these nanocomplexes are not able to transfect efficiently cells in culture. This low level of transfection can result to an alteration in uptake, endosomal escape or translation process. Although the zebrafish embryo study favors the uptake and/or endosomal hypotheses, it is difficult to compare the translational machinery of one-cell stage embryos and SDRC cells. To improve expression into the cytoplasm, mRNA must escape to endosome to be efficiently translated by the host translation machinery. As shown by Wolfert *et al.*³⁴⁹, the addition of chloroquine, an endosomal escape agent, could be a promising strategy to improve the capacity of PLL-based formulations to translate the antigen-coding mRNA after cell transfection.

b. Vectorization of mRNA using protamine as cationic intermediate

In a second strategy, we used protamine as cationic intermediate. Protamine is a natural protein derived from the sperm of fish and has an excellent ability to complex nucleic acids³⁵⁰. This protein contains an arginine-rich sequence which can condense the negatively-charged backbone of nucleic acids, as mRNA, and potentiating their cellular uptake. The protamine/mRNA complex induced immune activity with a predominant Th1 response^{141,142}.

To form PLA-NP/Protamine/mRNA nanocomplex, the two-step process based on layer-by-layer strategy was applied, as described for lysine-polymers. Protamine was adsorbed onto the PLA-NP surface, and then mRNA was added onto this two-component product to form nanocomplexes (**Figure 42A**).

During these steps, the quantity of each component was optimized. First, the optimal concentration for protamine was determined (**Figure 42B**). At low protamine concentrations (50 ng/ μ L and 100 ng/ μ L), the large hydrodynamic diameter (2-3,000 nm) of the complexes and measurement variability (PdI=0.6) might result from colloidal interactions. The neutral zeta potential of these PLA-NP-Protamine complexes might indicate that these particles aggregated faster³⁵¹. At higher concentrations (200 and 300 ng/ μ L) a colloidal stabilization of the formulations was observed, with a hydrodynamic diameter around 200 nm (211 nm and 208 nm for 200 and 300 ng/ μ L respectively) and a positive zeta potential (\sim 40 mV). Moreover, at these two concentrations the polydispersity index was up to 0.1 (0.140 and 0.100 respectively). The maximum adsorption efficiency and loading rate were obtained at the protamine concentration of 200 μ g/ μ L. At concentrations higher than 400 ng/ μ L, PLA-NP-Protamine complexes flocculated. Together, these results showed the ability to form stable PLA-NP/protamine nanocomplexes.

Résultats

The net surface charge of PLA-NP/protamine complex being positive, anionic mRNA mRNA can be complexed onto them by electrostatic interactions, as represented in the **Figure 42A**. Based on our previous results obtained with PLL, we tested mRNA concentrations around 40 ng/μL (**Figure 42C**). The concentration of shown the best adsorption efficiency and loading rate were obtained for mRNA at 30 ng/μL. Moreover, at this mRNA concentration, the hydrodynamic diameter (235 nm) and the negative zeta potential (-30 mV) reflected homogeneous nanocomplexes solutions.

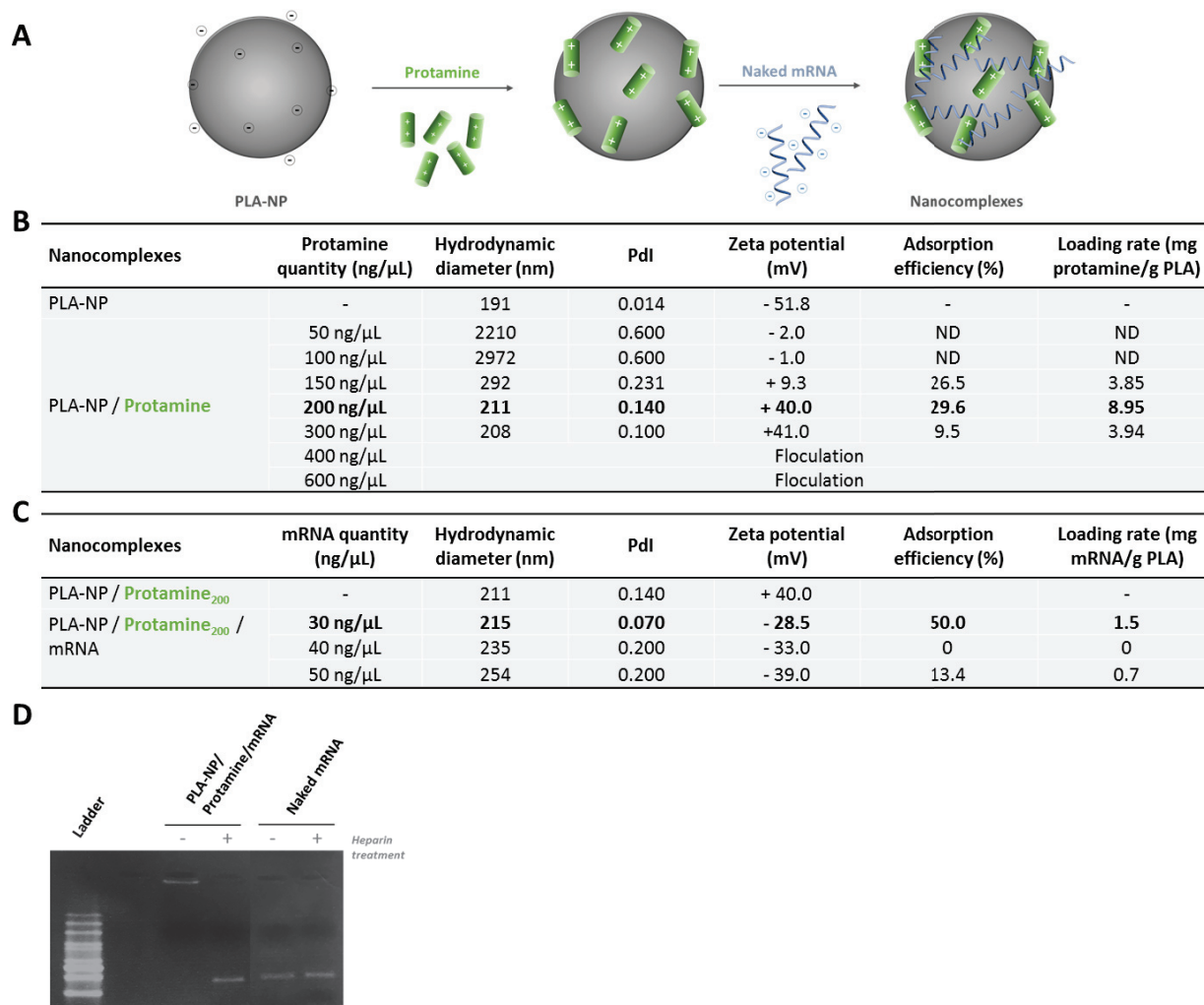


Figure 42: mRNA adsorption onto PLA-NP through protamine as intermediate.

(A) Schematic representation of the vectorization strategy of mRNAs onto PLA-NPs using Protamine in a two step process: cationic protamine was adsorbed onto negatively charged surface of PLA-NPs and then, anionic mRNA molecules were adsorbed onto this complex to form nanocomplex (B-C) Determination of optimal protamine concentration by adsorption of various quantities of protamine onto PLA-NP at 1% (B) or of optimal eGFP mRNA quantity by adsorption of different mRNA quantities onto PLA-NP/protamine complexes (C). The thermodynamic diameter, polydispersity index (PdI), zeta potential, adsorption efficiency and loading rate were indicated. Chosen concentration is in bold type. (D) Electrophoretic mobility shift assay showing eGFP mRNAs naked or complexed with PLA-NP/Protamine/mRNA nanocomplexes. A heparin treatment (+) was applied to some samples to detach mRNA from complexes.

To confirm the binding of mRNAs onto PLA-NP/protamine nanoparticles, an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied (**Figure 42D**). To detach mRNAs from the complexes, a heparin treatment (for PLA-NP detachment) was performed. We showed that mRNA complexed with

Résultats

PLA-NP/Protamine nanocomplexes were retained in the wells, while their electrophoretic mobility was identical to that of naked mRNA after heparin treatment

To conclude, we showed the possibility to complexe PLA-NPs and mRNA *via* protamine. Nevertheless, transfection of HEK293 or DC2.4 cells with protamine complexes did not allowed any mRNA expression, contrarily to naked mRNA assays carried with Lipofectamine reagent (Data not shown). This could be due either to the negative charge of the PLA-NP/protamine/mRNA complex that might prevent their interactions with cell membranes and/or an insufficient amount of mRNA complexed at the surface of the nanoparticles.

c. mRNA vectorization strategy using cell penetrating peptides

As described for PLL-based formulation, addition of mediators with an endosome escape activity can be promising to vectorize mRNA and to induce their translation into the cell cytosol. In fact, endosomes escape constitutes the critical step for an effective delivery of mRNA. For those reasons, we have chosen to test a vectorization strategy using CPP as intermediate.

Cell penetrating peptides (CPPs) with an amphipathic profile were described to be advantageous for nucleic acid vectorization and to induce their expression into the cytoplasm of target cells³⁵²⁻³⁵⁴. CPPs, with various amino acids sequences such as lysine- or arginine-rich peptides, assist nucleic acids delivery into cells. Among the fusogenic peptides, LAH4 and LAH4-L1, a LAH4 derivative³⁵⁵ and RALA¹⁴⁹ appear as potential suitable options for this project. Both of them have cationic charges, which provoke spontaneous electrostatic interactions with the negatively charged mRNA. They also promote the interaction with the anionic lipid membrane for cell penetration. Moreover, CPPs present an amphipathic α -helical structure with hydrophobic amino acids on one face and hydrophilic on the other one making them suitable for mRNA condensation and efficient membrane disruption³⁵⁶⁻³⁵⁸. These two peptides have in their sequences pH-sensitive residues that facilitate the endosomal escape by the generally accepted mechanism of “proton sponge” effect¹¹².

LAH4 is a lysine and histidine-rich peptide which is widely used for its antimicrobial and cell penetrating properties^{355,359} and LAH4-L1 is an isomer of LAH4 presenting two histidine residues creating a 80° angle in the hydrophilic face^{182,339}. According to Manson *et al.*, this characteristic makes of LAH4-L1 the most efficient vector peptides among LAH4 isomers, as it was proved in various cell lines³⁶⁰.

The sequence of LAH4-L1 contains histidine (H) and lysine (K) residues, which are polar and placed in the hydrophilic part of the peptide. Histidine residue acts as donor and proton acceptors at the same time, at neutral pH, due to its imidazole group. Hence, it favors the endosomal escape, while

Résultats

lysine amino acids tend to ameliorate the mRNA condensation. Due to its protonable amino group and high pKa, it tends to be positively charged at pH 7. Thus, it could interact with negative charged molecules³⁵⁵. RALA is composed of 30 amino acids and 7 of them are arginine residues¹⁵¹. The guanidine group located in the arginine residues plays an important role in the interaction with cell membrane, i.e. for an efficient cell uptake. Moreover, the sequence formed by hydrophobic amino acids inserted between the hydrophilic arginine residues results in an amphipathic α -helical structure³⁵⁸. This conformation has given better results in comparison to other non-amphipathic arginine-rich peptides for mRNA condensation in the formation of nanocomplexes (peptide-mRNA) and efficient cell transfection¹⁴⁹.

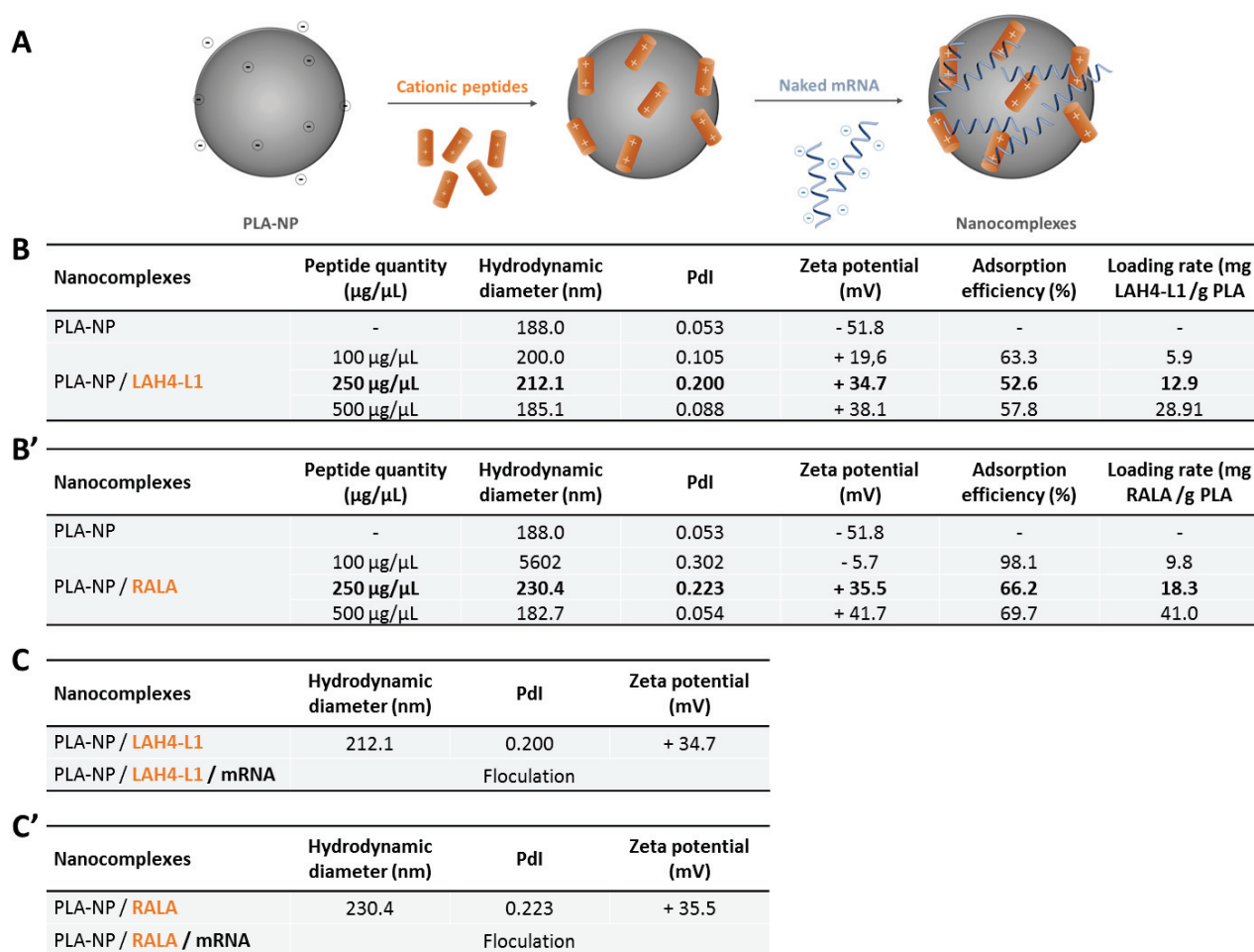


Figure 43: mRNA adsorption onto PLA-NP through cationic peptides as intermediate.

(A) Schematic representation of the vectorization strategy of mRNAs onto PLA-NPs using LAH4-L1 and RALA, two cationic peptides, in a two step process. Cationic peptides were adsorbed onto negatively charged surface of PLA-NPs and then, anionic mRNA was added onto complexes to form nanocomplexes. (B-B') Comparison of thermodynamic diameter, polydispersity index (PdI) and zeta potential of NP-PLA naked or coated with LAH4-L1 (B) or RALA (B') at various concentrations. The adsorption efficiency of peptide onto PLA-NP at each tested concentration and the loading rate (quantity of peptide / quantity of PLA-NP) were also indicated. (C-C') Comparison of thermodynamic diameter, polydispersity index (PdI) and zeta potential of NP-PLA naked or coated with LAH4-L1 (C) or RALA (C') in presence of mRNA. Each value provided is the average of four series of measurements ($N=1$).

Using the procedure previously described, nanocomplex formation consisted on (1) the adsorption of CPPs onto the PLA-NP surface and (2) the adsorption of mRNA onto PLA-NP/CPPs

Résultats

complexes (**Figure 43A**). As shown in **Figures 43B and B'**, the optimal quantity of LAH4-L1 and RALA to form complexes with PLA-NP was 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. For LAH4-L1, a very poor loading rate was obtained at lower quantity, and any size and PDI modifications were obtained at higher quantity. For RALA, a quantity at 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ induced an aggregation of formulations and as for LAH4-L1 no modification of size and PDI was observed at 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Then various quantity of mRNA was added to PLA-NP/CPPs complexes, but for each concentration, a flocculation was obtained (**Figure 43C and C'**). This two-step strategy to vectorize mRNA was not applicable with CCPs, under the experimental conditions used here.

In literature, the vectorization of nucleic acid by CPPs has been shown after formation of polyplexes. Those polyplexes are composed of CPPs at various ratios and nucleic acids. To vectorize mRNA using CPPs, a new strategy was designed. To that end, mRNAs were first complexed with cationic peptides to form polyplexes, which then were adsorbed onto PLA-NPs to produce nanocomplexes (**Figure 44A**). In this strategy, we compared three CPPs with nucleic acid condensation properties. These cationic peptides are RALA, LAH4-L1, but also LAH4 which presents two leucine and two histidine residues at the place of two histidines and two leucines in LAH4-L1, respectively.

First, the optimal ratio of peptide/mRNA was analyzed. Based on literature, it was shown that an excess of CPPs was needed to induce efficient expression suggested that a critical peptide concentration in endocytic vesicles is required for the efficiency release of nucleic acids³⁵⁵. Based on those results, we tested 6 different ratios (peptide/mRNA; W/W). Fixed concentration of mRNA (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) was mixed V/V with different concentrations of peptide. To confirm that mRNA was complexed to peptide, we performed gel mobility shift assays as presented for LAH4 in **Figure 44B**. The result showed that mRNA retardation occurred at a Peptide/mRNA w/w ratio of 8 :1. Few amount of peptides were necessary to complex the mRNA. Moreover, the same LAH4/mRNA complexes were added to PLA-NP, and retardation occurs at the same LAH4/mRNA w/w ratio of 8 :1.

As described previously, an excess of peptide enhances transfection efficiency. We decided to test the transfection efficiency of a larger range of ratio in two cell types, DC2.4 and HEK293. From this study, we determined that the minimal amount of peptide necessary to obtain an efficient transfection in the two cell models was 20:1.

In a last part, the optimal ratio (20:1) of CPPs /mRNA was added to PLA-NP (0.5%) V/V. Three different peptides were tested (LAH4, LAH4 L1 and RALA). The hydrodynamic diameter and zeta potential of nanocomplexes were analyzed by DLS (**Figure 44D**). The addition of mRNA peptide polyplexes onto PLA-NPs ($\sim 180 \text{ nm}$; -40 mV) induced an increase in size and an inversion of charge

Résultats

surface in the case of LAH4 and LAH4-L1. Moreover, we can note that the polydispersity index (PDI) remains low, reflecting that nanocomplexes with LAH4 and LAH4 L1 were homogeneous in size. On the other hand, PLA-NP/RALA/mRNA nanocomplexes are not monodisperse ($PDI > 0.2$), and a great variability was observed between the different experiments indicating a lack of reproducibility.

Together, these results showed the ability to form stable nanocomplexes between mRNAs and PLA-NPs using LAH4 and LAH4-L1 peptides.

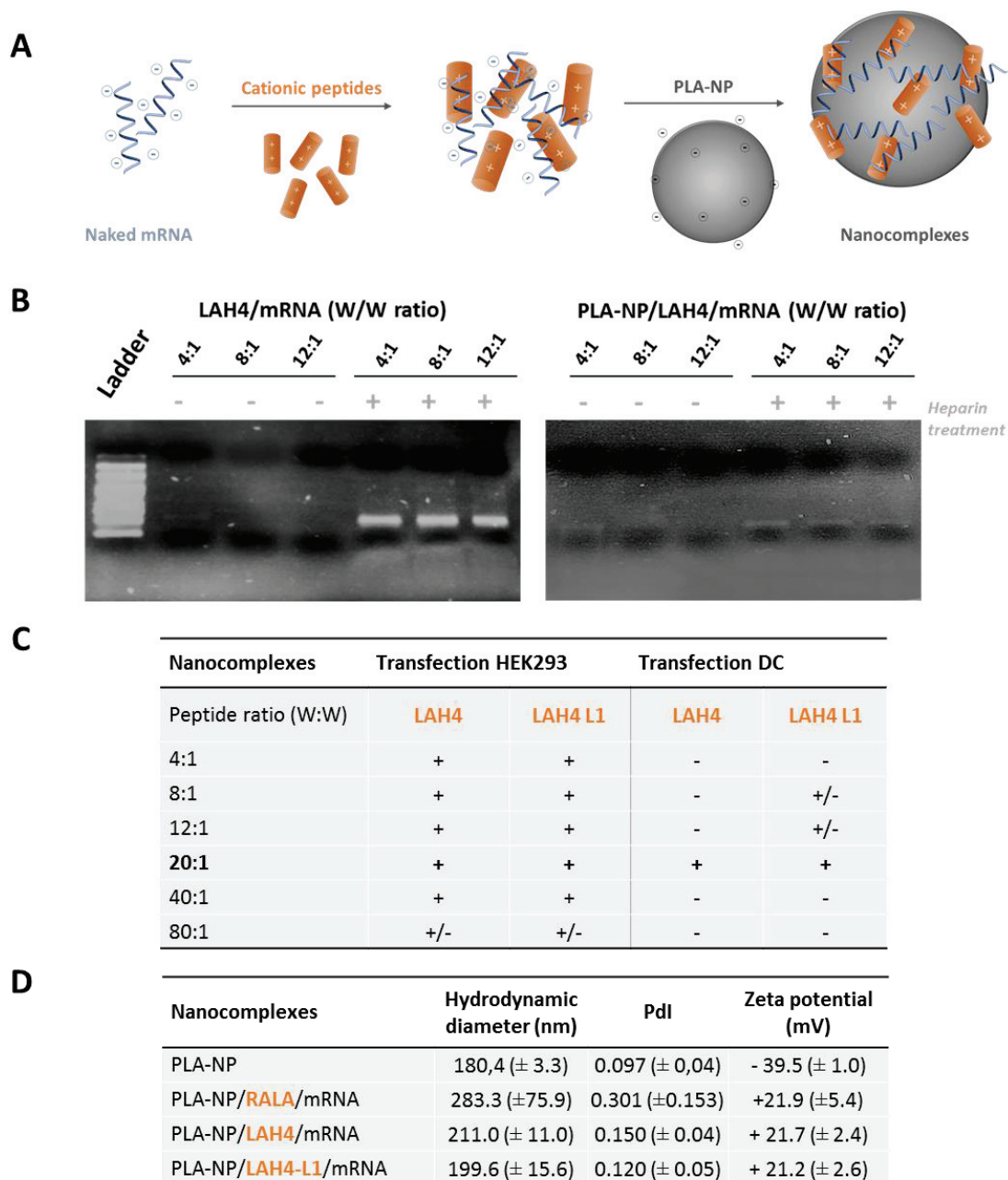


Figure 44: mRNA/cationic peptide complexes adsorption onto PLA-NP.

(A) Schematic representation of the vectorization strategy of mRNAs onto PLA-NPs using CPPs. (B) Electrophoretic mobility shift assay showing eGFP mRNAs naked or complexed with LAH4/mRNA or PLA-NP/LAH4/mRNA nanocomplexes. A heparin treatment (+) was applied to the samples to detach the mRNA from the complexes. (C) Expression efficiency in HEK293 and DC2.4 of CPPs/mRNA complexes at various ratios (W:W). +: expression of mRNA; -: absence of expression; +/-: low expression (D) Comparison of thermodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of NP-PLA naked or coated with RALA, LAH4 or LAH4-L1 in presence of mRNA. Each value provided is the average of four series of measurements ($N=3$).

Résultats

The functionality of those polyplexes and nanocomplexes was analyzed in 1-cell stage zebrafish embryos, as previously described. An optimized eGFP mRNA provided by Trilink was administered at the dose of 20 pg per embryo, and the eGFP expression was observed 24 h later. For each condition, representative embryos were presented in **Figure 45A** and the percentage of eGFP-positive embryos was indicated on associated image. Positive control was performed with naked eGFP mRNA and negative control corresponded to non-injected embryo. As expected, 88% of injected embryos with naked mRNA expressed eGFP in a sustained manner and none of non-injected embryos shown green fluorescence. In presence of RALA-based formulations, eGFP expression was detected reflecting a functionality of complexed mRNA. In fact, 75% and 53% of embryos expressed eGFP after RALA/mRNA or PLA-NP/RALA/mRNA administration, respectively. However, LAH4 and LAH4-L1-based formulation presented a lower capacity to induce efficient expression in this model. Only 40% and 22% of embryos expressed eGFP after LAH4/mRNA or PLA-NP/LAH4/mRNA administration, respectively, with low fluorescence intensity. This effect was more pronounced with LAH4-L1 (33% and 3%, respectively).

The viability of embryos was observed 24 h post injection, and those cationic peptides-based formulations seem to be toxic for embryos, the presence of PLA-NP reducing this negative effect (**Figure 45B**).

Because mRNA complexed to CPPs-based formulations was functional in zebrafish eggs, we decided to analyze their transfection efficiency in cells. eGFP mRNA expression was observed 24 h after transfection in two cell types by fluorescence microscopy (**Figure 45C**). A similar transfection efficiency of both cell lines was obtained using the different CPP/mRNA polyplexes. Similarly, LAH4 and LAH4-L1-based formulation have succeeded to express the eGFP protein into HEK293 and DC2.4 cell models, and shown the same profile of expression than polyplexes devoided of PLA-NPs. However, RALA based NP-PLA formulations did not efficiently transfect cells or allow the transport of a functional mRNA into the cytoplasm. This negative result might come from the colloidal instability of this formulation.

The use of LAH4 and LAH4-L1 has contributed to efficiently immobilize mRNA onto the PLA-NP. Our data demonstrated the importance of those cell-penetrating peptides to allow an efficient *in vitro* transfection and mRNA expression.

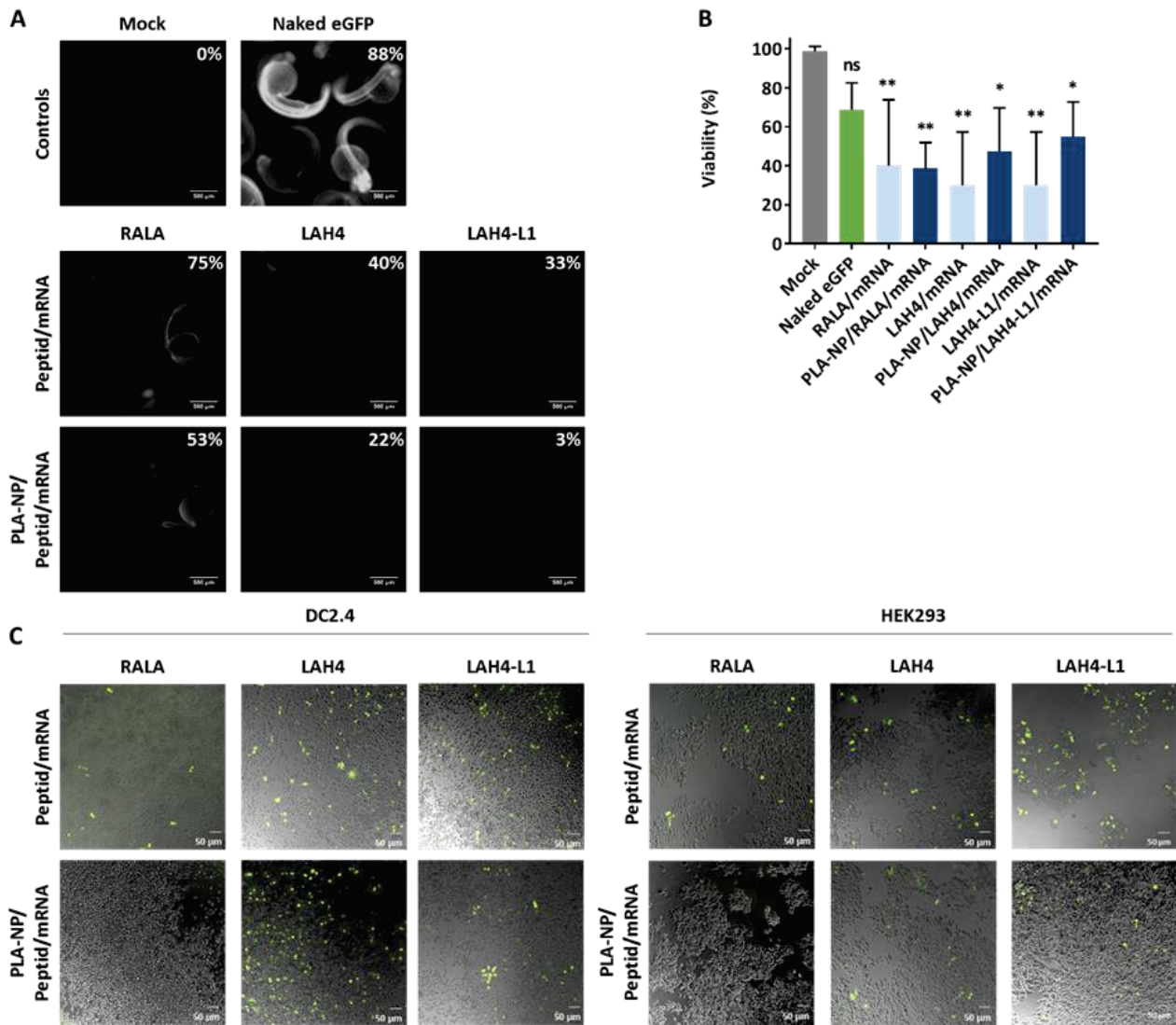


Figure 45: mRNA adsorption onto PLA-NP through cationic peptides as intermediate.

(A) Expression of eGFP mRNA 24h after 1-cell-stage zebrafish embryo injection with naked eGFP or RALA, LAH4 and LAH4-L1-based formulations. Percentage of eGFP positive embryos for each condition was indicated on the corresponding image. 20 embryos were analyzed in four independent experiments and one representative image was presented. Mock; non-injected zebrafish embryos (B) Viability of embryos 24 h after injections. 20 embryos were analyzed in four independent experiments. Statistical significance of differences with mock was determined using one-way Anova: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. (C) Expression of eGFP mRNA after transfection on DC2.4 and HEK293 cells in serum-free medium for 4 h (50 ng mRNA/well). The transfection efficiency was measured 18h after the addition of mRNA complexes to the cells by microscopy.

4. Discussions and conclusions

In recent years, interest in using *in vitro* transcribed (IVT) messenger RNA (mRNA) to elicit immune responses has exponentially increased^{123,118,343}. While the majority of developing mRNA-vaccine platforms are based upon lipid nanoparticles (LNP)²³, we focused on the development of new formulations consisting to decoration of PLA-NPs by mRNA through cationic peptide intermediates. Those NPs are versatile biodegradable and biocompatible vectors able to codeliver antigen and/or immunostimulatory molecules into DCs, the major antigen presenting cells^{186,255,260,319}. However, PLA-NP as well as mRNA are negatively charged making vectorization of those biomolecules onto

Résultats

PLA-NP surface a real technological challenge. Different strategies have been performed to allow the formation of homogeneous and stable PLA-NP/cationic peptide/mRNA formulations. Then, the preservation of a functional RNA, the transfection efficiency, and a partial toxicity evaluation of these platforms have been evaluated after injection into the cytoplasm of just-fertilized zebrafish embryos or incubation with cells in culture. As discussed below, formulations including cell-penetrating peptides have given the more promising results.

In this study, layer-by-layer approaches were tested to bring together mRNA onto PLA-NP. To do that, a cationic intermediate was either adsorbed onto the PLA-NP, and mRNA was added to the formed complex or a precomplex made between the cationic molecule and mRNA was applied onto PLA-NP. First the cationic intermediates were adsorbed onto PLA-NPs and then, mRNA was adsorbed onto PLA-NP/Intermediate complexes to form nanocomplexes. For each tested intermediates, we have optimized formulations to obtain stable and homogeneous nanocomplexes, with a polydispersity index in the final formulation close to 0.1. First, we tested Poly-L-Lysine (PLL) and Dendrigraft Poly-L-Lysine (DGL) to vectorize mRNA onto PLA-NP surface. mRNA can be adsorbed onto PLA-NP with those intermediates without alteration of mRNA functionality. The toxicity of DGL-based formulations prompted us to use only PLL-formulations. We have shown that despite the possibility of adsorbed mRNA onto PLA-NP *via* PLL, this formulation failed to transfect cells. Secondly, we tested protamine as intermediate. Even if adsorption of mRNA was possible onto PLA-NP using protamine, a very low final quantity of this biomolecules was present in formulation. Moreover, no eGFP expression was detectable after addition of protamine-based formulations in cell cultures. The protamine/mRNA interaction is described to be very tight and to induce a low level of expression⁵². Our results were also in accordance with this publication although this intermediate has shown promising results for immune response activation. In fact, protamine/mRNA polyplexes trigger a strong and balanced humoral immune response with Th1 and Th2 aspect³⁶¹. Moreover, we can note that despite this result, Curevac, the first society using protamine, seems to privilege lipid nanoparticles for mRNA-based vaccine development³⁶². Then, to vectorize mRNA, we analyzed the potential of Cell Penetrating Peptides (CPPs) as intermediate. CPPs represent a vast group of molecules, which comprise short sequence of amino-acid residues (usually 5-30 aa), and which present an ability to condensate mRNA into polyplexes. Among them, we have chosen to work with RALA, LAH4, and LAH4-L1, LAH4-derivative^{149,339,355,359,360}. Using the same strategy in layer-by-layer, those CPPs can be adsorbed onto PLA-NPs but despite the use of various mRNA quantities, mRNA formulation seems to be not possible. In fact, a flocculation was observed.

In literature, CPPs are used as mRNA condensing agent to form polyplexes with a high transfection capacity^{149,339,363}. In a second part of this study, we designed another strategy based on a

Résultats

two step process: (1) mRNA was first condensing by CPPs in a polyplexes and then (2), this polyplexes were adsorbed onto PLA-NP to form nanocomplexes. To that end, we used three different CPPs: RALA, LAH4 and LAH4-L1. Using this strategy, we obtained homogenous formulations for LAH4 and LAH4-L1-based formulations. RALA-based formulations induce an aggregation (PDI = 0.301) and despite the functionality any transfection efficiency was observed. It is possible than expression inducing in zebrafish eggs is mediate by non-associated polyplexes or free mRNA in solution. RALA peptide have been induce an efficient capacity in the condensation of pDNA to induce high expression efficiency *in vivo*¹⁵¹.

In this study, we shown that PLA-NP/protamine/mRNA failed to transfect cells in comparison to others nanocomplexes. This nanocomplexes present a net negative charge at their surface whereas others complexes were positively charged. To penetrate into cells, the uptake is mediated by electrostatic interaction between cationic vectors and glycosaminoglycan presents at the surface of cell membranes³⁶⁴. This wrapping effect is also influence by the surface charge of complexes and can explain our results³⁶⁴. Moreover, we only observed an efficient expression after cells transfection with CPP-based formulations, in serum-free medium. The positively charged groups of CPPs, often composed of amines which are protonated at physiological pH, lead to an ion imbalance in an acid environment that results in endosomal rupture^{150,339,354}. In fact, LAH4-derivatives and RALA peptides have a pH-dependent lytic activity, allowing the translocation of RNA from the endosomal compartment into the cytosol. This translocation represents a crucial process for mRNA translation into the cytosol, antigen processing and presentation on MCH-I and/or -II¹¹⁸. This effect also called 'proton sponge' hypothesis has been demonstrated for various materials³⁶⁴, and is due to the composition of CPPs. In fact, the presence of arginine residues facilitated nucleic acid binding and the hydrophobic leucines induced interactions with lipid membranes. These two regions are separated by alanine residues, resulting in a α -helical structure. The glutamic acids at each terminus enhance solubility in water (pH 7.4). Mainly composed of arginine, lysine and histidine residues, those CPPs present an amphipathic helix with a stretch of positive charges, inducing nucleic acid condensation^{340,352}. Moreover, histidines are believed to enable endosome escape by protonation of their imidazole groups at low pH^{339,365}.

To conclude, in this study, we developed stable and homogeneous mRNA platforms using CPPs as intermediate. The capacity of those LAH4- and LAH4-L1-based/PLA-NP formulations to induce mRNA expression into cells making them a promising platform in mRNA-vaccine development.

Acknowledgments

We thank the AniRA-Cytométrie platform (T. Andrieu and S. Dussurgey), the PLATIM-Microscopie platform (C. Chamot, C. Lionnet, and E. Chatre), and the PRECI fish facility (L. Bernard and R. Renard) of SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8).

Funding

ALC was supported by a regional fellowship (ARC Santé / Région Auvergne Rhone-Alpes) for three years. Financial support is gained from ANRS in the framework of HIVERA JTC 2014 (HIV-NANOVA) and from ANR-16-CE20-0002-01 (FishRNAVax) to BV, ED and CLG.

II. EVALUATION DE L'EFFICACITE DES FORMULATIONS POUR L'EXPRESSION DES ARNm ET L'ACTIVATION DE REPONSES IMMUNITAIRES *IN VITRO*

Les vaccins à ARNm sont actuellement en plein essor dans le domaine de la vaccinologie et font l'objet de nombreux essais cliniques en cours²³. Leur utilisation dans les formulations vaccinales présente de nombreux avantages, dont une capacité à transfecter les cellules dendritiques (DC). Une fois dans le cytoplasme des DC, l'ARNm sera traduit en une protéine antigénique capable d'activer les réponses immunitaires à large spectre avec des réponses innée et adaptative^{23,118}. Cependant, les ARNm seuls ont une capacité de transfection limitée nécessitant l'utilisation de système de délivrance^{23,24,120}. Alors que la majorité des études portent sur des approches utilisant des lipides cationiques²³, peu de recherches se sont orientées vers l'utilisation de polymères^{148,184,363,366} et aucun travaux ne rapportent l'intérêt de nanoparticules polymériques pour la délivrance des ARNm. Dans le chapitre précédent de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence une stratégie basée sur l'adsorption des ARNm à la surface des NP-PLA par utilisation de peptides cationiques amphipathiques comme intermédiaire : les peptides RALA, LAH4 et LAH4-L1. Ces peptides permettent de condenser les ARNm en polyplexes qui peuvent ensuite être adsorbés à la surface des NP-PLA pour former des nanocomplexes.

Dans une première partie, l'objectif repose sur l'évaluation du potentiel transfectant des formulations, l'étude des mécanismes aboutissant à leur expression dans les cellules et l'analyse de la capacité d'induction de réponses immunitaires.

L'interaction entre les ARNm et les NP-PLA *via* l'utilisation de ces trois peptides cationiques a tout d'abord été vérifiée par plusieurs méthodes. Des mesures de la taille, de l'indice de polydispersité et du potentiel zeta des formulations ont été effectuées pour informer sur les caractéristiques de ces dernières. Nous avons également réalisé une analyse par retard sur gel, permettant de visualiser l'association de l'ARNm et des complexes, et une analyse par FRET renseignant sur la proximité des composants. La stabilité des formulations conservées à 4°C a été suivie pendant 21 jours.

Une fois cette interaction entre les polyplexes et les NP-PLA vérifiée, nous avons évalué la capacité de ces complexes à transfecter différents modèles cellulaires *in vitro* : les DC2.4, un modèle de cellules dendritiques, et les lignées HEK293 et HeLa, deux lignées de cellules épithéliales avec

Résultats

une forte capacité de transfection. L'expression des ARNm vectorisés par nos formulations a été quantifiée par cytométrie en flux et une cinétique d'expression a été réalisée. Afin de comprendre les mécanismes intracellulaires permettant l'expression de l'ARNm dans les DC, les mécanismes d'internalisation et l'impact de l'échappement des endosomes ont été analysés.

Enfin, l'impact des formulations sur l'activation de réponses immunitaires innée et adaptative a été évaluée. Nous avons analysé l'activité immunostimulante des formulations sur des cellules rapportrices de TLR7 et TLR3, deux PRR impliqués dans la reconnaissance des ARN. De plus, en utilisant des cellules dendritiques primaires (moDC), nous avons analysé la capacité d'activation des réponses innée et adaptative par trois méthodes complémentaires : (1) l'expression de 84 gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative a été étudiée par qPCR après 6 heures de stimulation, (2) l'expression de marqueurs de maturation (CMH-I, CMH-II, CD80, CD86, CD40) a été quantifiée par cytométrie en flux 24 h et 48 h après stimulation des moDC, et (3) la sécrétion de cytokines et chimiokines dans ces surnageants a été testée par Luminex.

Les résultats obtenus pour cette partie font l'objet d'une publication soumise dans le journal Biomaterials en Octobre 2018. Les résultats de cette publication sont insérés dans le corps du texte ci-dessous.

Poly(lactic acid) Nanoparticles and Cell-Penetrating Peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in Dendritic cells triggering their activation

Anne-Line Coolen, Céline Lacroix, Perrine Mercier-Gouy, Emilie Delaune, Claire Monge, Jean-Yves Exposito, Bernard Verrier

Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, Université Lyon 1, CNRS, IBCP – Lyon, France

Correspondence: bernard.verrier@ibcp.fr

Abstract

Messenger RNA-based vaccines have the potential to trigger robust cytotoxic immune responses, which are essential for fighting cancer and infectious diseases like HIV. Dendritic Cells (DCs) are choice targets for mRNA-based vaccine strategies, as they link innate and adaptive immune responses and are major regulators of cytotoxic and humoral adaptive responses. However, efficient delivery of antigen-coding mRNAs into DC cytosol has been highly challenging. In this study, we developed an alternative to lipid-based mRNA delivery systems, using poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) and cationic cell-penetrating peptides as mRNA condensing agent. The formulations are assembled in two steps: (1) formation of a polyplex between mRNAs and amphipathic cationic peptides (RALA, LAH4 or LAH4-L1), and (2) adsorption of polyplexes onto PLA-NPs. LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes are taken up by DCs via phagocytosis and clathrin-dependent endocytosis, and induce strong protein expression in DCs in vitro. They modulate DC innate immune response by activating both endosome and cytosolic Pattern Recognition Receptors (PRRs), and induce markers of adaptive responses in primary human DCs in vitro, with prevalent Th1 signature. Thus, LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA represent a promising platform for ex vivo treatment and mRNA vaccine development.

Keywords: mRNA-vaccine, nanoparticle (NP), poly(lactic acid) (PLA), LAH4-L1, Cell-Penetrating Peptide (CPPs), dendritic cells

1. Introduction

Over the past decades, traditional vaccines consisting of killed, inactivated or subunit pathogens have been successfully used against infectious diseases allowing an efficient and protective humoral immune response². Despite their major successes in modern medicine, these approaches have limitations and are not applicable for chronic infections or cancers where cellular immune responses are mostly required¹². These diseases require vaccine formulations that promote robust cell-mediated (Th1-biased) immune response instead of humoral (Th2-biased) immune response. Cellular immune responses with CD8⁺ cytotoxic T cells (CTLs) have the unique potential to eliminate infected or altered cells, and may have a central role in host responses to viral infection like HIV and cancers¹³. CTLs are elicited against intracellular antigens produced in the cytosol, processed by the proteasome and loaded onto major histocompatibility class I (MHC-I) complexes for cell surface presentation³. This requires that vaccine proteins have to be delivered to the cytosol of antigenic presenting cells (APCs), like dendritic cells (DCs), which play a central function in immunity by orchestrating innate and adaptive immune responses, through antigen presentation¹⁰⁰.

In recent years, interest in using *in vitro* transcribed (IVT) messenger RNA (mRNA) to elicit CTLs and/or Th1-biased immune responses has exponentially increased^{22,23,55,343}. mRNA vaccines have several advantages over other vaccine approaches, like a high safety profile, a flexibility to encode any protein as antigen and a simple, inexpensive and rapid production, which is of great importance in case of pandemic crisis^{23,118,343}. Moreover, mRNA is transiently translated in cells and is degraded in a relatively short but controllable amount of time^{23,55}. This capacity allows a more controlled antigen exposure and minimizes the risk of tolerance induction that can be associated with long-term antigen exposure¹¹⁸. One other important advantage is the higher capacity of mRNA-based vaccines to transfect non-dividing cells, as DCs, where mRNA is translated into functional protein¹¹⁸. This intracellular production of antigenic protein is responsible for antigen presentation and T-cell activation, with both CD4⁺ and CD8⁺ T aspects. That is why, mRNA have shown considerable promises for both prophylaxis and the treatment of various diseases, including HIV^{23,174} and more than ten types of cancers^{23,184}.

However, to induce mRNA expression in DC, their efficient delivery into the cytosol before degradation must be achieved. In fact, exogenous mRNA must penetrate the barrier of the lipid membrane in order to reach the cytoplasm to be translated into a functional protein. Two major strategies have been described to target DCs with mRNA²³. The first strategy is based on *ex vivo* mRNA loading into DCs and re-infusion of the transfected cells¹⁰¹. *Ex vivo* DC loading allows an optimal control of the cellular target with high transfection efficiency. However, this is an expensive

Résultats

and constrained approach. The second strategy consists in a direct mRNA injection in a more rapid and cost-effective approach, but without cell type specificity. Both approaches have been explored with a variety of formulations to protect the antigenic mRNA from RNases, facilitate its uptake into cells and improve their potency²³. Promising results have been obtained with several types of delivery system (reviewed in ²³), including polyplexes^{38,148,175,176,367} or lipoplexes^{60,155,157,158}. But the most efficient approach currently used is based on mRNA vectorization of cationic lipid-based nanoparticles, and particularly in lipid nanoparticles (LNP)^{32,165–167,193}. Some formulations have already entered clinical trials in the field of cancer immunotherapy and infectious diseases like *influenza* virus and HIV²³. In contrast, reports on the use of polymeric nanoparticle carriers for mRNA delivery are scarce, even if they have shown great potentials in vaccination field^{186,255,368,369}.

Biodegradable nanoparticles based on poly(lactic acid) (PLA) backbone have gained recent interest in vaccine development. Indeed, PLA is a biodegradable and biocompatible polymer which presents a high safety profile³⁶⁹ and has been approved by the Food and Drug Administration²⁵⁴. PLA-nanoparticles (PLA-NPs) constitute a versatile vectorization platform for their capacity to encapsulate and/or adsorb various antigens and immunostimulant molecules^{186,255,260,345}. PLA-NPs have shown advantages in the vaccinology field for the induction of immune responses against various model antigens after parenteral administration in mammals^{186,260,319}. Moreover, PLA-NPs are efficiently taken up by DCs *in vitro* and *in vivo*^{256,260,263}. In fact, the nanoparticle format presents advantages for the delivery of mRNA to DCs and could improve their uptake by these cells¹¹². However, both the PLA-NP surface and mRNA biomolecules are negatively charged. To adsorb mRNAs onto the surface of PLA-NPs, it is necessary to reverse the net surface charge of the NP or to design a mRNA intermediate complex which is positively charged. Thus, the use of cationic intermediates can be a promising approach. Indeed, in a pioneering work, Bettinger *et al.* demonstrated that low molecular weight cationic polymers form complexes with mRNAs¹⁴⁸. Moreover, the addition of a membrane-active peptide is required for the endosomal escape of these complexes, and efficient mRNA translation in the cytosol. Recent studies have proposed that cationic cell-penetrating peptides (CPPs), small peptides composed of 8 to 30 amino acids with a net positive charge, might constitute an excellent vehicle for mRNA delivery¹⁴⁹. They combine low charge densities with an ability to induce membrane disruption for endosomal escape. In fact, this process is essential to allow cytosol delivery of mRNA where it can be recognized by protein synthesis apparatus and translated into protein¹¹⁸.

In this study, we have developed and compared new mRNA platforms using three different CPPs (RALA, LAH4 and LAH4-L1) as cationic intermediates for vectoring mRNA onto PLA-NPs. We have evaluated the interest of these peptide/mRNA polyplexes and PLA-NP/peptide/mRNA nanocomplexes to transfect DCs and activate innate and immune signaling responses through

transcriptomic analysis. The highest protein expression in DCs was observed with LAH4-L1 and PLA-NP/LAH4-L1 formulations. These formulations trigger innate immunity through PRR activation and activate adaptive immune responses, including a prevalent Th1 aspect. To understand the mechanisms of each formulation involved in these *in vitro* activations, we also have investigated the uptake mechanism and the intracellular traffic of particles in DCs, indicating a clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis pathways. Thus, these data show that LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes are promising platforms for mRNA vaccine delivery to DCs.

2. Materials and methods

a. Production of in vitro transcribed mRNA

pGEM4z-HxB2gag-64A encoding Gag antigen was kindly given by Guido Vanham (University of Antwerp, Antwerp, Belgium). The HxB2 gag gene is under the control of a T7 promoter and a unique *EheI* restriction site is located just downstream of the (A)₆₄ tail. pGEM4z-HxB2gag-64A was propagated in NEB® Stable *Escherichia coli* bacteria (New England Biolabs (NEB), France) and purified using NucleoBond Xtra Maxi Endotoxin Free kit (Macherey-Nagel, France). The plasmid was linearized with *EheI* restriction enzyme (NEB), purified using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, France), and used as a DNA template for *in vitro* transcription. Capped mRNA transcripts (IVT) were produced using the T7 MessageMachine Kit (Ambion, Life technologies, France). mRNA purification was performed by DNase I digestion, followed by LiCl precipitation and mRNA pellet was solubilized in RNase-free water.

eGFP mRNA encoding green fluorescent protein was provided by Guido Vanham (University of Antwerp, Antwerp, Belgium). RNA was quantified by spectrophotometric analysis at 260 nm and analyzed by standard agarose gel electrophoresis to confirm the integrity of this full-length mRNA. All mRNAs were stored in RNase free water at -80 °C.

b. Production of fluorescent labeled mRNA

Gag mRNA was labeled with MF488 using the Label IT Nucleic Acid Labeling Reagent kit (Mirus, Euromedex, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5 µg of mRNA was stained with kit reagents for 1 h at 37°C, and fluorescent mRNA was purified using ethanol precipitation. The pellet was resuspended with 10 µL of nuclease-free water and mRNA labeled was quantified by spectrophotometric analysis, while mRNA integrity was checked through agarose gel electrophoresis.

Résultats

c. Polyplexes and nanocomplexes preparation and characterization

To form polyplex, mRNA was diluted in RNA-free water at 40 ng/ μ L and mixed (V/V) with 800 ng/ μ L in RNA-free water of LAH4-L1 (KKALLAHALHLLALLALHLAHLKKA), LAH4 (KKALLALHHLAHLALHLALALKKA) or RALA (WEARLARALARALARHLARALARALRACEA) peptides (GeneScript, China). Then, equal volumes of those polyplexes and PLA-NP (at 0.5% in water; Adjuvatis, France) were mixed to form PLA-NP/Peptide/mRNA nanocomplexes.

The hydrodynamic diameter and zeta potential (surface charge) of mRNA formulations were determined by dynamic light scattering (DLS) using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, U.K.).

Complexes were also analyzed using an electrophoretic mobility shift assay (ESMA). In some samples, a heparin/proteinase K treatment was performed in order to separate mRNA from the complexes. Briefly, complexes were first treated or not with heparin (Sigma, France) during 1 h at RT, and secondly with proteinase K (NEB, France) at 56°C during 30 min. Each sample (treated or not) containing 200 ng mRNA was loaded into one well and analyzed by electrophoresis in a standard 1% agarose gel in presence of ethidium bromide (Genesee Scientific).

To highlight the association between mRNA and PLA-NP, a Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) assay was performed. Components were associated as described above, with a Ribogreen fluorescent mRNA (Quant-IT RibogreenTM RNA assay kit, Invitrogen) and CellTraceTM BODIPY-TR Methyl Ester fluorescent PLA-NP (Adjuvatis, France). 100 μ L of each complex was deposited in triplicate in black 96-plate well (flat-bottom). Fluorescence was recorded on Tecan i-control Infinite M1000) (Tecan, Swiss) for RibogreenTM (460nm/520nm), BODIPY-TR (561nm/625nm) and FRET (460nm/625nm). Fluorescence was determined as the mean of three independent experiments and results were normalized to remove the contribution of free PLA-NPs.

d. Expression efficiency analysis

Immortalized DC2.4 (a murine bone marrow derived dendritic cell lines³³² and kindly provided by Jacqueline Marvel group (CIRI, France)) was propagated in complete RPMI-1640 medium with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 mM Hepes and 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco, Life Technologies, France) at 37° and 5 % CO₂. HeLa (ATCC[®] CCL-2TM) and HEK293(ATCC[®] CRL-1573TM) were cultured in DMEM containing 10% heat-inactivated FBS (Gibco, Life Technologies, France) at 37°C and 5 % CO₂. Cells were used with a low passage number (less than 12).

Résultats

One day before transfection, cells were seeded in a 96-well plate at the density of 25 000 cells (in 100 μ L of complete medium) per well. After 24 h, complete medium was replaced by 100 μ L of serum-free medium. Formulations were added to cells with a volume allowing the transfection of 20 ng of eGFP mRNA or equivalent volume for controls. Four hours after transfection, supernatants were removed and 100 μ L of complete medium was added. Then, cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ until the analysis (0 to 48 h). Positive control of transfection was performed with Trans IT®-mRNA Transfection Kit (Mirus, Euromedex, France) using the manufacturer's recommendations. Briefly, 0.5 μ g of mRNA was added to 50 μ L of serum-free medium, and 1 μ L of Trans IT mRNA reagent and 1 μ L of mRNA Boost Reagent were then added. After 5 min at room temperature, complex mixture was added to cell at the desired concentration. Negative controls were performed with peptide alone, PLA-NP/Peptide complex, naked PLA-NP and naked mRNA at equivalent concentrations that nanocomplexes.

To quantify the percentage of eGFP fluorescent-positive cells and Mean Fluorescence Intensity (MFI), transfected DCs were harvested, stained with propidium iodide (Invitrogen) and analyzed by AccuriC6 flow cytometer (BD Biosciences) on the platform "AniRA cytométrie" (SFR BioSciences, UMS3444/CNRS). Dead cells were excluded using propidium iodide, and then living DCs were gated based on their large forward scatter (FSC) and large side scatter (SSC) profile, to avoid cell debris. Data analysis was performed with BD Accuri C6 Software CFlow Plus (BD Biosciences). Data were determined as the mean of three independent experiments.

e. Stability of formulations

To verify formulation stability, polyplexes and nanocomplexes were prepared and conserved at 4°C during 21 days. At each time-point, the hydrodynamic diameter and zeta potential were determined by DLS using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, U.K.) and the expression efficiency was determined as described in the precedent part by flow cytometry.

f. Cytotoxicity of formulations

Cytotoxicity of complexes was evaluated by Presto Blue Assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, DC2.4 cells were seeded at a density of 25 000 cells/well into 96-well plates a day prior to the transfection. Transfection with complexes was performed, as previously described, with a volume allowing the transfection of 20 ng of eGFP mRNA or equivalent volume for controls, and cytotoxicity was measured 24 h later. After incubation, 10 μ L of Presto Blue Reagent was added and plates were incubated 10 min at 37°C. Fluorescence was detected on Tecan i-control Infinite M1000 (560nm/590nm; Bandwidth 10 nm; Gain 91) (Tecan,

Résultats

Swiss). Fluorescence was determined as the mean of two replicates and three independent experiments.

g. Endocytosis mechanisms analysis

DC2.4 cells were seeded into 96-well plates at the density of 25000 cells/well a day prior to the transfection. Medium was removed 15 min before transfection and 100 μ L of serum-free medium in presence of one molecule inhibitor was added. Used concentrations and mode of action of genistein, chlorpromazine, dynasore, nocodazole, amiloride, pimozide and cytochalasine inhibitors were indicated in supplementary data (**Table IX**). After 15 min, cells were treated with formulations (with a volume allowing the transfection of 20 ng of eGFP mRNA or equivalent volume for controls) during 2 h. To analyze uptake efficiency, cells were incubated with an MFP488 fluorescent mRNA alone or in complex. After 2 h, cells were harvested, treated with 0.2% trypan blue and analyzed by flow cytometry, as described previously.

h. Endosome escape evaluation

DC2.4 were seeded into 96-well plates at the density of 25000 cells/well a day prior to the transfection. Cells were treated 15 min before transfection with 175 mM of Bafilomycine A1 (Invivogen, France) in 100 μ L of serum-free media. Complexes and associate controls were added (with a volume allowing the transfection of 20 ng of eGFP mRNA or equivalent volume for controls) for 4 h. After medium replacement, cells were incubated 12 h at 37°C and 5% CO₂, and then they were harvested and analyzed by flow cytometry as described previously.

i. Immunostaining of moDCs

To verify gag expression in moDCs, p17 protein (a component of gag polyprotein) was stained in moDCs. Cells were seeded at a seeding density of 50 000 cells/well into μ Slide 12 well Chamber (Ibidi, Germany) and transfected as previously described with a volume allowing the transfection of 40 ng of mRNA or equivalent volume for controls in 200 μ L of serum-free medium for 2 h. Then, cells were rinsed with PBS 1X, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at RT, permeabilized in 0.1% Triton-PBS 1X at RT for 15 min and saturated with 1% BSA-PBS 1X for 1 h at RT. After saturation, cells were incubated 2 h with anti-p17 (5 μ g/mL; kindly given by Christophe Guillon, CNRS/University of Lyon, France), washed and stained with secondary antibody FITC anti Mouse IgG (5 μ g/mL; Jackson Immuno Research) in the dark for 1 h at RT. Then, cells were washed and mounted on glass slides using Vectashield mounting medium with DAPI (Vector laboratories). Slides were analyzed using a SP5 upward confocal microscope (Leica) with 63 \times /1.4NA objective and data were analyzed using ImageJ Software.

Résultats

j. Determination of innate immune-stimulatory activity

HEK-Blue hTLR7 and HEK-Blue hTLR73 reporter cell lines (InvivoGen) were used as specified by the manufacturer to detect TLR7 and TLR3 stimulation. Briefly, 50 000 cells/well were seeded into 96-well plates and stimulated during 24 h with the different formulations. TLR7 or TLR3 activation was monitored by quantifying the amount of the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) which is placed under the control of IFN- β minimal promoter fused to five NF- κ B and AP-1-binding sites. The level of alkaline phosphatase can be determined with a detection medium that turns blue in its presence. Sample absorbance was measured at 620 nm using a microplate reader (Bio-Rad).

k. Preparation and stimulation of human monocyte-derived DCs

Monocytes were purified from human peripheral blood and differentiated into moDCs as previously described²⁶⁰. Briefly, PBMCs were isolated from venous blood samples (from Etablissement Français du Sang, Lyon) by density gradient centrifugations using Ficoll-Paque™ plus and Percoll (GE Healthcare). Remaining erythrocytes, NK, B- and T- cells were then depleted by anti-glycophorin A, anti-CD56, anti-CD19 and anti-CD3 antibodies (Beckman Coulter) respectively, using Dynabeads® Pan Goat antimouse IgG (Invitrogen). To differentiate purified monocytes (0.5×10^6 cell/ml) into MoDCs, cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), gentamycin (50 U/ml), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in the presence of 62.5 ng/ml of human interleukin-4 (IL-4) (Miltenyi Biotec, France) and 75 ng/ml of human granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Miltenyi Biotec, France). After 6 days, complexes were added to 1×10^6 differentiated moDCs in similar culture medium depleted of serum for 2 h (volume allowing the transfection of 660 ng of gag mRNA or equivalent volume for controls). After addition of FCS, cells were incubated 24 h or 48 h at 37 °C, 5% CO₂. DCs only cultured in complete RPMI medium were used as a negative control of stimulation, and those cultured in the presence of 2.5 μ g/ml of LPS (Invivogen, France) were used as a positive control.

DC maturation was assessed by cell surface immunostaining using monoclonal antibodies against lineage markers and co-stimulatory molecules. Cells were then stained with anti-CD1a-FITC, anti-CD14-FITC, anti-HLA DR-FITC, anti HLA-ABC-FITC, anti-CD40-PE, anti-CD80-PE, and anti-CD86-PE mAbs (BD Pharmingen). Data were acquired using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Résultats

l. Real-time qPCR analyses

The different complexes were incubated 2 h to 4×10^6 of differentiated moDCs without serum (volume allowing the transfection of 2640 ng of gag mRNA or equivalent volume for controls). FBS was added and cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂. After 6h of incubation, RNA was extracted from moDCs using QIamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). Using 0.5 ng of mRNA per conditions, the expression of 84 genes was quantified using an RT² Profiler PCR Array Human Innate and Adaptive Immune Response plate (PAHS-052Z, Qiagen). Data were acquired using a AriaMx Real-time PCR System (Agilent) and analyzed with GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen).

m. Quantification of cytokines

The experimental procedure is similar to the one used for moDC stimulation. After stimulation by complexes during 24 h and 48 h, supernatant was harvested and cytokine and chemokine quantifications were performed using a Luminex Magpix instrument (Bio-Rad) in combination with human Miliplex cytokine/chemokine immunoassay kit (HCYT-MAG-60K-PX29, Merck). Data were analyzed with BioPlex Manager (BioRad). For each condition, concentrations were determined as the mean of three replicates for each independent experiment (N=3). We excluded from the standard curve any points with accuracy outside of 70-130 %. The coefficient of variation of the three assayed were shown to be less than 20% CV for all data.

n. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Version 6.0 software. All of the data are presented as the mean \pm SEM. Difference between groups was analyzed as described in figure legends. Statistical significances were indicated on the figures.

3. Results

a. mRNAs can be associated onto PLA-NPs via cationic peptides

In order to vectorize mRNAs, we designed novel formulations based on polymeric nanoparticles, PLA-NPs, which have demonstrated several advantages in the vaccination field. Whereas hydrophobic molecules can be efficiently encapsulated in the core of PLA-NPs, the hydrophilic nature of mRNAs prevents their simple encapsulation into PLA-NPs. Instead, we developed strategies to adsorb mRNAs at the surface of PLA-NPs. Because the PLA-NP surface and mRNAs are both negatively charged, we used cationic peptides as an intermediate between mRNA and PLA-NPs. We compared three positively charged cell-penetrating peptides (CPPs) with nucleic

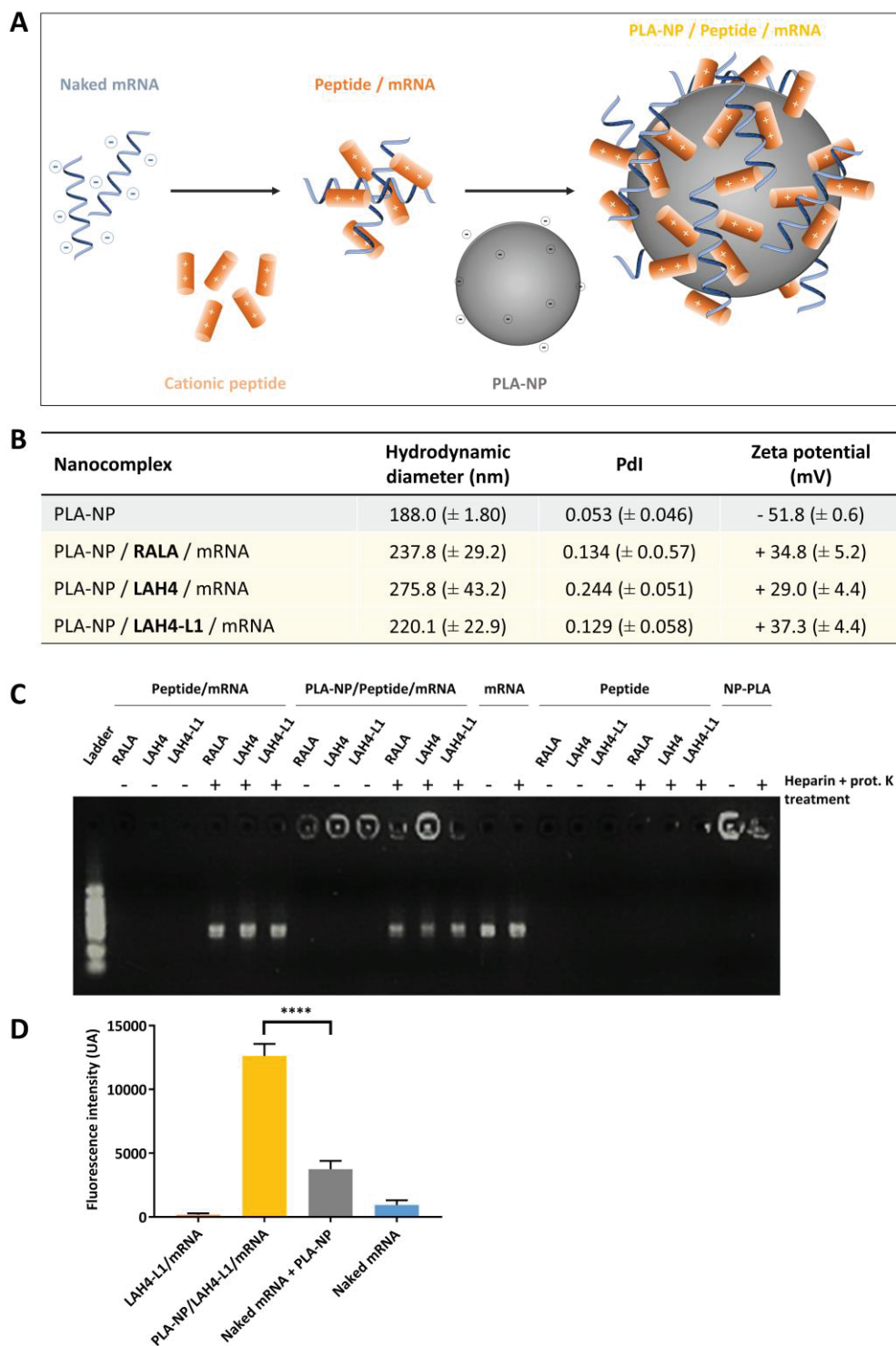


Figure 46: mRNA can be vectorized by PLA-NPs using cationic peptides as intermediates.

(A) Schematic representation of the vectorization strategy of mRNAs onto PLA-NPs. Negatively charged mRNA was associated with cationic peptides (RALA, LAH4 or LAH4-L1) to form Peptide/mRNA polyplexes. Then, this complex was adsorbed onto PLA-NPs to form PLA-NP/Peptide/mRNA nanocomplexes. (B) Comparison of thermodynamic diameter, polydispersity index (PdI) and zeta potential of nanocomplexes formed between the 3 peptide/mRNA combinations and naked PLA-NPs. Each value provided is the average of four series of measurements and four independent experiments (N=4). (C) Electrophoretic mobility shift assay showing eGFP mRNAs complexed with peptides or in PLA-NP/Peptide/mRNA nanocomplexes. A heparin and proteinase K (prot. K) treatment (+) was applied to the samples in order to detach the mRNA from the complexes. (D) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) analysis. Red fluorescence emitted by different formulations was evaluated after green fluorescent mRNA (RiboGreen) excitation (n=3). Statistical significance between two groups was determined using a one-way Anova: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Résultats

acid condensation properties: RALA, LAH4 and LAH4-L1. Those cationic peptides are predicted to have a helical structure with amphipathic profile, which presents advantages for cellular uptake and membrane disruption (**Figure S1**). In this strategy, mRNAs were first complexed with cationic peptides to form polyplexes, which were subsequently adsorbed onto PLA-NPs to produce nanocomplexes, as described in Materials and Methods section (**Figure 46A**). The PLA-NP doses used in the formulations were shown to be non-toxic in a previous work from our laboratory³⁷⁰.

The hydrodynamic diameter and zeta potential of nanocomplexes formed with the 3 cationic peptides were analyzed by DLS (**Figure 46B**). The addition of Peptide/mRNA polyplexes onto PLA-NPs (~ 188 nm; -50 mV) induced an increase in size and an inversion of the surface charge, as reflected by the zeta potential of ~ 30mV, suggesting that the 3 types of polyplexes are efficiently adsorbed onto PLA-NPs. The LAH4 peptide induced the formation of larger nanocomplexes (~ 275.8 nm) than RALA and LAH4-L1 (~ 237.8 nm and ~ 220.1 nm, respectively) with the highest polydispersity index (PDI). For RALA and LAH4-L1 peptides, the polydispersity indexes in the final formulations were close to 0.1 (PDI=0.134 and 0.129, respectively), reflecting that the nanocomplexes were homogenous in size. As shown for LAH4-L1 in Fig. S2, the pre-formulation peptide/mRNA polyplexes presented a high polydispersity index (PDI=0.3), the size distribution graph indicating the presence of aggregates. Yet, the addition of PLA-NP, which are highly monodisperse and negatively charged, allowed a modification of the equilibrium of charges to form a monodisperse final product (PDI=0.129) with a rearrangement of peptide/mRNA polyplexes at the surface of PLA-NP. Finally, we showed that the colloidal formulations were stable for 14 days at 4°C, as indicated by hydrodynamic diameter and zeta potential measurements (results obtained with LAH4-L1 peptide are shown in **Figure S3**).

To verify the ability of peptides and PLA-NPs to bind mRNAs, an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was applied (**Figure 46C**). To detach mRNA from the complexes, a treatment with heparin (for PLA-NP detachment) and proteinase K (for peptide degradation) was performed. The same results were obtained for RALA, LAH4 and LAH4-L1 peptides: mRNA complexed with one of these peptides or in PLA-NP nanocomplexes were retained in the wells, while their electrophoretic mobility was identical to that of naked mRNA after heparin/proteinase K treatment. To confirm the binding of Peptide/mRNA polyplexes onto the surface of PLA-NPs, another test based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) was developed. In this test, we used red fluorescent PLA-NPs (containing BODIPY-TR Methyl Ester dye) and a green fluorescent mRNA (labelled with RibogreenTM). The close proximity of green fluorescent mRNAs to red fluorescent PLA-NPs causes red fluorescence emission (625 nm) upon RibogreenTM excitation (460 nm). PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes displayed significantly higher 625 nm emission than that

Résultats

obtained in samples containing a simple mix of mRNAs and PLA-NPs (**Figure 46D**), confirming the presence of mRNA nearby the core of PLA particles (distance < 10 nm).

Altogether, these results confirm the ability to form stable nanocomplexes of mRNAs and PLA-NPs using RALA, LAH4 or LAH4-L1 peptides. mRNA condensation capacity of CPPs was conserved after polyplex adsorption onto PLA-NP.

b. LAH4-L1-based formulations allow efficient mRNA uptake and protein expression in dendritic cells

The ability of mRNA complexes to transfect DCs was evaluated *in vitro* using the mouse DC2.4 cell line as a model (**Figure 47A-C**). To that end, each complex containing an equivalent of 20 ng of eGFP mRNA was added to DC2.4 cells in serum-free conditions, and the percentage of GFP positive cells (**A-B-C**) and the Mean Fluorescence Intensity (MFI) (**A'-B'-C'**) were measured after 16h by flow cytometry. As a control, the same amount of naked eGFP mRNA was transfected into DC2.4 cells using the commercial TransIT-mRNA transfection kit (Mirus Bio). As shown in **Figure 47A-A'**, mRNA complexes formed with RALA peptides failed to efficiently transfect DCs, while a low transfection capacity was observed in LAH4 peptide assays (**Figure 47B-B'**). However, LAH4-L1-based formulations induced an efficient transfection of DC2.4. With LAH4-L1/mRNA polyplexes or PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes, about 35% or 57% of DC2.4 cells expressed eGFP mRNA, respectively, with a significantly higher transfection efficiency than TransIT control assay (**Figure 47C**). Moreover, the intensity of expression was significantly more important using PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes than TransIT or LAH4-L1/mRNA assays (p-value < 0.05) (**Figure 47C'**). These results indicate that transfection efficiency is potentiated by the presence of PLA-NPs in the formulations.

A time-course study of eGFP expression in DCs was performed to compare mRNA/LAH4-L1 polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes. At 4 h post transfection, eGFP-expressing DCs were already detectable, and the number of positive cells reached a plateau in all assays at 16-24 h post transfection (**Figure 47D**). Interestingly, a bi-phasic curve was observed for the intensity of fluorescence, with a rapid increase until 16 h and a gradual decrease after 24 h (**Figure 2D'**). The amount of GFP positive cells and the MFI were higher with PLA-NP/LAH4-L1/mRNA than with LAH4-L1/mRNA or TransIT-mRNA complexes, up to 48 h post transfection (**Figure 47D-D'**, **Figure S4**). These nanocomplexes showed stable expression efficiency after storage at 4°C for up to 7 days (results obtained with LAH4-L1 peptide were shown in **Figure S4**). We did not observe any toxicity of the formulations in DCs under the conditions of the experiments (**Figure 47E**).

Résultats

The uptake of LAH4-L1-based formulations by different cell types was investigated. LAH4-L1 polyplexes and nanocomplexes failed to transfect HEK293 and HeLa cells, two epithelial cell lines, in the same experimental conditions (**Figure 47F-G**). These results indicate that the transfection capacity of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA complexes depends on cell type and seem to be particularly efficient to target DCs.

Thus, LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA formulations constitute efficient methods for DC transfection with low doses of mRNA. We focused on these two formulations for further analysis.

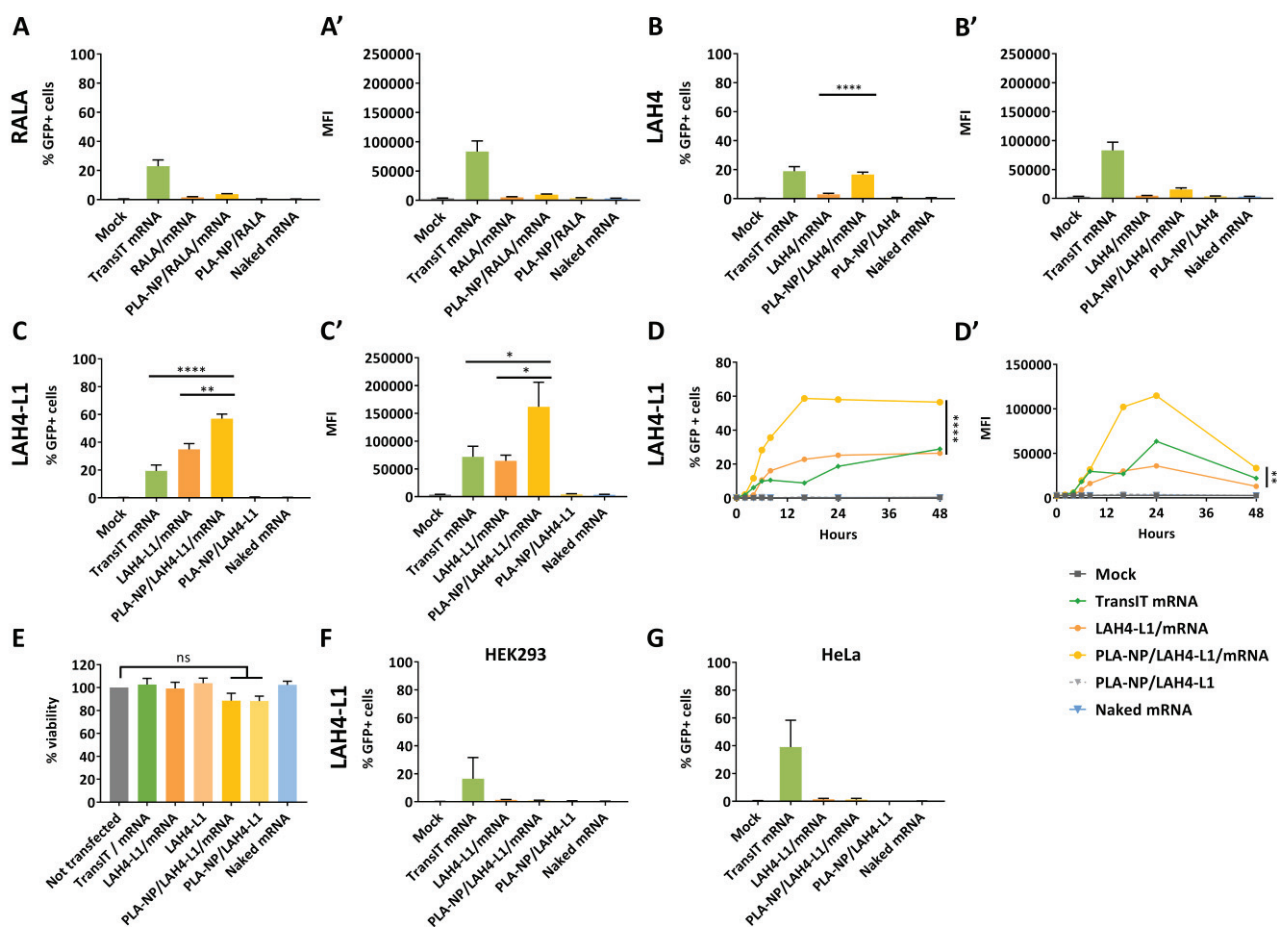


Figure 47: LAH4-L1-based formulations allow efficient mRNA expression in DC2.4 cells *in vitro*.

Untreated DCs (Mock), TransIT eGFP mRNA (positive control), eGFP mRNA complexes and negative controls (PLA-NP/LAH4-L1 and naked mRNA) were transfected in serum-free medium for 4 h (20 ng mRNA/well). The transfection efficiency was measured 16h after the addition of mRNA complexes to the cells. (**A-C'**) Percentage of green fluorescent protein (eGFP) positive DC2.4 cells (**A-B-C**) and mean fluorescence intensity (MFI) (**A'-B'-C'**) were quantified after transfection in presence of RALA-, LAH4- and LAH4-L1-based complexes ($n=3$). (**D-D'**) Kinetics of expression efficiency after transfection with LAH4-L1-based formulations. The percentage of eGFP positive DC2.4 cells (**D**) and the MFI (**D'**) are presented. (**E**) Cytotoxicity of LAH4-L1-based nanocomplexes on DC2.4 cells. (**F-G**) Percentage of eGFP positive DC2.4 cells after LAH4-L1-based formulations transfections in (**F**) HEK293 and in (**G**) HeLa cells ($n=3$). Statistical significance of differences between two groups was determined using one-way or two-way Anova: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

c. mRNA vaccine formulations enter in dendritic cells through clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis

To understand the intracellular mechanisms allowing mRNA expression, we monitored the cellular uptake of LAH4-L1-based formulations by DCs. We studied their mechanisms of internalization by treating DC2.4 cells with various endocytosis inhibitors. Targets and action mechanisms of each inhibitor were described in supplementary **Table IX**. To visualize the complexes, we used MFP488-labelled fluorescent mRNAs. The mRNAs were complexed with LAH4-L1 or PLA-NP/LAH4-L1 and incubated for 2 h with inhibitor treated DC2.4 cells. To distinguish between complexes located inside the cells or at cell surface, extracellular fluorescence was quenched with trypan blue²⁵¹. The percentage of cells taking up MFP488 mRNAs and the MFI were measured by flow cytometry (**Figure 48A-B**). Surprisingly, the same profiles were obtained for LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes. Aggregation presence with LAH4-L1/mRNA polyplexes can explain this result. Cells treated with chlorpromazine or dynasore, two clathrin-mediated endocytosis inhibitors, and with pimoizide, a phagocytosis inhibitor, showed a significant decrease of MFP488 fluorescence (p -value < 0.0001). In agreement with a role of the clathrin-dependent and phagocytosis pathways, inhibition of microtubule and actin polymerization with nocodazole and cytochalasin D, respectively, also induced an important decrease of complexes uptake by DCs.

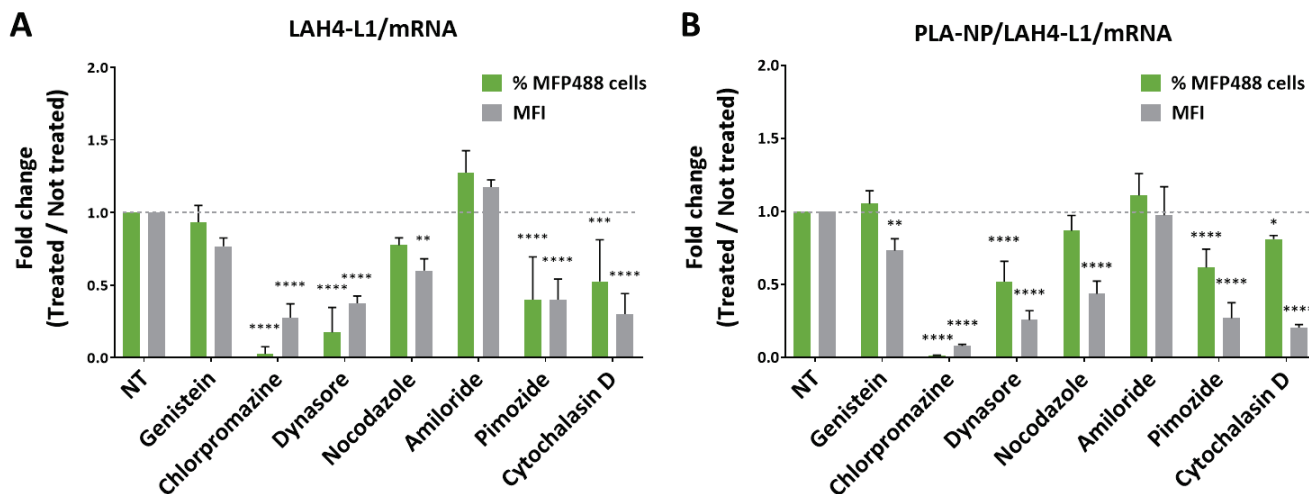


Figure 48: Clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis are involved in complexes uptake by DC2.4 cells. Uptake efficiency of MFP488-labelled mRNA complexed with LAH4-L1 (A) or PLA-NP/LAH4-L1 (B). MFP488 mRNA was incubated for 2 h with DC2.4 cells in presence of various inhibitors, and uptake efficiency was quantified by flow cytometry ($n=3$). Green bars: percentage of cells which present intracellular MFP488 fluorescence; White bars: Mean of fluorescence (MFI). Green bars: percentage of GFP positive cells; Grey bars: MFI. The value of not treated cells (NT) were set as 1. Statistical significance between two groups was determined using a two-way Anova test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Résultats

These results suggest that clathrin-dependent endocytosis and phagocytosis are important mechanisms involved in the uptake of LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes by DCs. On the contrary, the lack of inhibition by genistein and amiloride suggests that caveolae-dependent endocytosis and macropinocytosis are not essential for this uptake.

d. Endosomal escape is needed to induce efficient translation

The previous results suggest that clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis are involved in the cellular uptake of formulations. These pathways induce the formation of vesicular structures that eventually fuse with lysosomes. To allow mRNA expression, nanocomplexes must escape the endosomes before lysosome fusion. Positive charges of amphipathic cationic LAH4-L1 have been involved in this endosomal escape through the proton sponge effect³³⁹. To evaluate the importance of this proton sponge mechanism, we performed a transfection in presence of Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar proton ATPases, which is essential for proton regulation in endosome. The percentage of eGFP positive cells and the MFI were measured after 16 h by flow cytometry (Figure 49). In presence of Bafilomycin A1, the percentage of eGFP positive cells and the MFI were drastically reduced.

These results show the importance of endosome acidification for eGFP mRNA expression, in agreement with a model whereby a proton sponge effect allows mRNA escape from the endosomes to the cytosol.

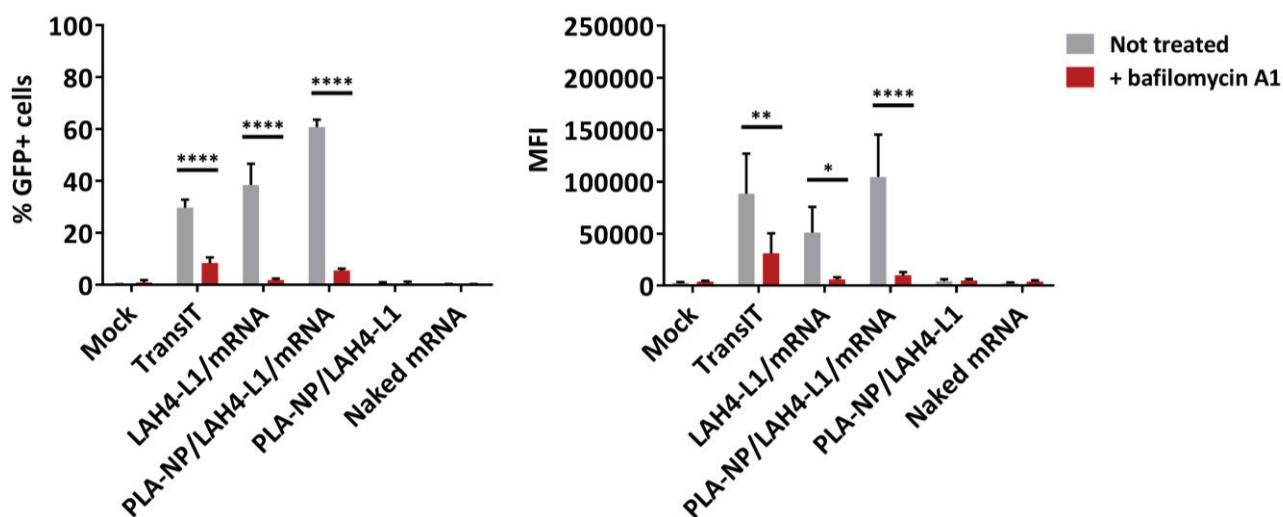


Figure 49: Endosomal escape is essential for mRNA expression in DC2.4 cells.

Percentage of eGFP positive DC2.4 cells and mean fluorescence intensity (MFI) were quantified after 16 h of transfection by LAH4-L1-based formulations in absence (grey bars) or in presence (red bars) of bafilomycin A1 ($n=3$). Statistical significance between two groups was determined using a two-way Anova test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Résultats

e. mRNAs in LAH4-L1-based formulations induce an innate immune-stimulatory activity through PRR activation

We then analyzed the immune-stimulatory properties of LAH4-L1-based formulations, using mRNAs coding for the Gag protein of HIV-1, a model antigen protein relevant for vaccine development. DCs express a repertoire of PRRs allowing the recognition of a large range of pathogen molecules, including some RNA sequences. The intrinsic adjuvant activity of formulations was evaluated *in vitro* using cell lines which overexpress only one specific PRR (h-TLR7 or h-TLR3). These cell lines were transfected with different nanocomplex concentrations and PRR activation was evaluated (Figure 50A-B).

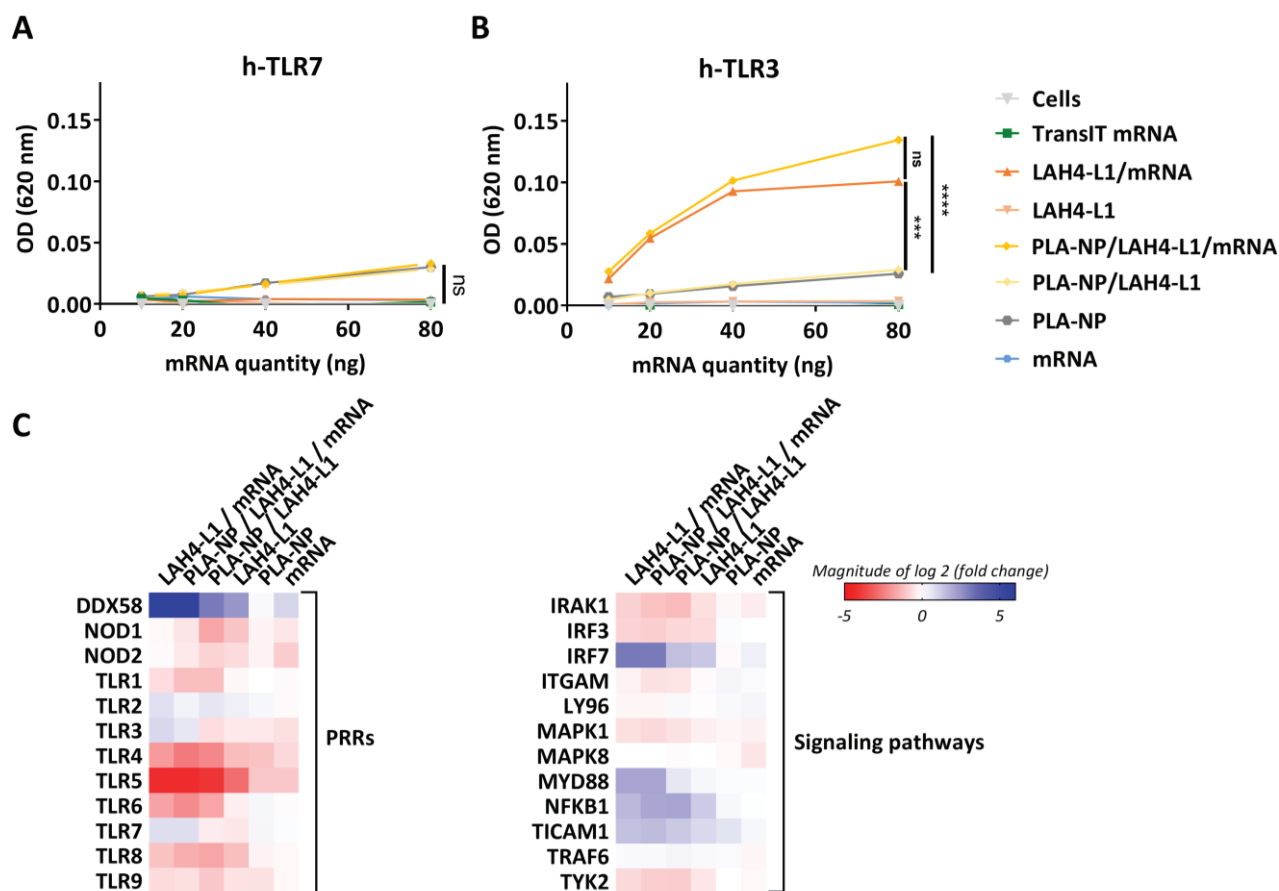


Figure 50: mRNA complexes stimulate the innate immunity through PRR activation.

(A-B) Evaluation of PRR activation via the TLR7 and TLR3 pathways in HEK-Blue hTLR7 and HEK-Blue hTLR3 cells with mRNA formulations ($n=2$; $N=2$ and $n=2$; $N=3$ for h-TLR7 and h-TLR3 respectively). Statistical significance between two groups was determined using a two-way Anova test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. (C) Expression profile of TLR pathway genes in moDCs after 6 h stimulation with mRNA formulations. This heat map represents the mean of three independent experiments performed with the supernatant of moDCs derived from three different patients, duplicate points being used in each experimental sample.

LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA complexes induced a significant h-TLR3 activation in a dose-dependent manner, while the same complexes devoid of gag mRNA only activated weakly h-TLR3 cells while a non-significant h-TLR7 activation was observed. These results show the specific TLR3 immune-stimulation activity of PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes.

Résultats

In this experiment, the mRNA complexed onto LAH4-L1-based formulations seemed to be taken up by modified HEK293 cell lines to activate endosomal PRR, whereas **Figure 47F** showed that mRNAs are not translated into functional protein in HEK293. Those observations suggest an alteration of RNA escape from endosome or of translation in this cell type.

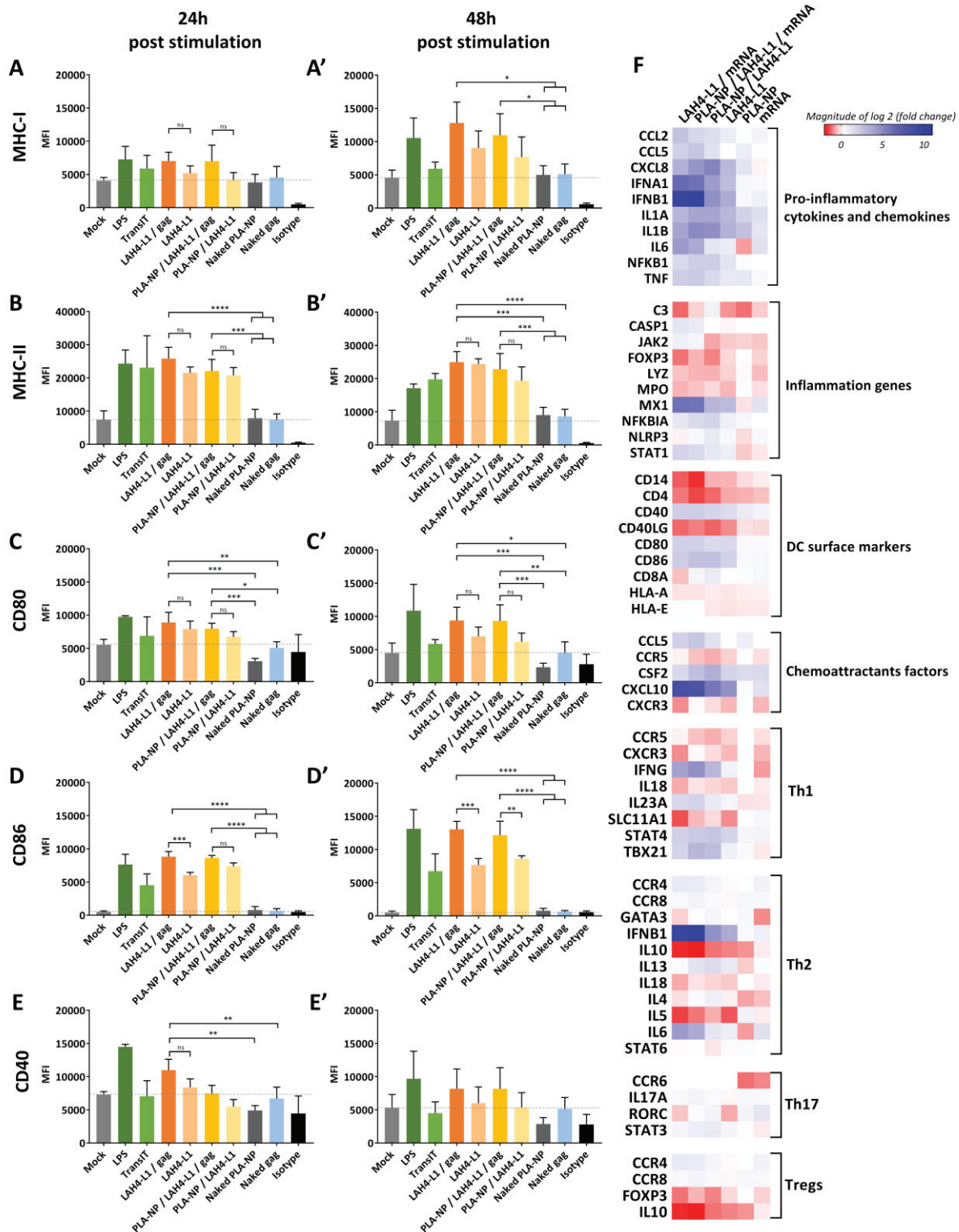
To further analyze the immune-stimulatory properties of LAH4-L1-based formulations, subsequent experiments were performed using primary DCs derived from human monocytes (moDCs), a cellular model particularly suitable for activation studies. A comparative gene expression analysis was carried out on moDCs treated with the different formulations, using the Human Innate and Adaptive Immune Responses RT2 Profiler™ PCR Array. After 6 h of stimulation, the formulations induced a modification in the expression pattern of multiple genes encoding TLR and signaling proteins associated to their pathways (**Figure 50C**). Main effects were observed for formulations containing the LAH4-L1 peptide. PLA-NPs and mRNAs alone did not have the ability to modify the gene expression profile. However, the presence of mRNA in formulations (see LAH4-L1/mRNA vs LAH4-L1 and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA vs PLA-NP/LAH4-L1) upregulated the expression of TLR3, TLR7 and DDX58 (also called RIG-I), three PRR receptors involved in RNA recognition⁴. Their target genes (IRFF7, MYD88, NFKB1, and TICAM1) were also upregulated after LAH4-L1/mRNA stimulation. Interestingly, these formulations decreased the expression of other TLR genes, suggesting that the presence of mRNAs favors a signaling through TLR3/TLR7/DDX58. However, it should be noted that the data shown in **Figure 50C** only represent a signature of moDCs 6h after transfection.

f. LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA complexes promote moDC maturation

DCs are central effectors of immunity, acting as messengers between the innate and adaptive immune systems. Their stimulation induces their maturation, antigen presentation and the production of cytokines and chemokines leading to the immune response.

In order to evaluate the impact of our formulations on moDC maturation, we first verified the translational efficiency of gag mRNAs in moDCs. As shown in **Figure S5** moDCs transfected with gag mRNA formulations express the HIV-1 gag protein.

Then, moDCs were stimulated with formulations containing an equal amount of gag mRNAs for 24 h and 48 h, and the expression of different markers of maturation was analyzed by flow cytometry (**Figure 51A-E'**).



Résultats

LAH4-L1/gag-mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/gag-mRNA formulations induced a moDC maturation similar to that observed with a positive control using lipopolysaccharide (LPS). More precisely, these formulations significantly increased MHC-I, MHC-II, CD80 and CD86 expression after 24 h and 48 h of stimulation, in comparison to naked gag mRNAs or formulations devoid of mRNAs. Comparable but less significant results were obtained for the cluster of differentiation CD40. Altogether, these results suggest that mRNA-based formulations promote moDC maturation in our experimental model.

In addition, the expression of 84 genes associated with innate and adaptive immune responses was evaluated in moDCs after 6 h of stimulation with the different formulations. As shown in **Figure 51F**, LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA complexes induced the overexpression of most of the tested genes encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IFN- α , IFN- β , IL-6 and proteins implicated in inflammation, like MX1. This overexpression was induced by LAH4-L1 peptide and amplified by the presence of mRNA. In agreement to the previous expression data, genes involved in DC maturation (CD40, CD80 and CD86) were also overexpressed, validating the precedent results. As represented in the heat map, immune cell chemoattractant factors (CCL5 and CXCL10) and Th1-related genes (IFNG, IL23A, STAT4 and TBX21) were overexpressed whereas Th2-related (IL-10, IL-4, IL5 or Stat6), Th17-related (IL17A, STAT3) and Tregs genes were downregulated or stable. These results indicate that mRNAs complexed in LAH4-L1-based formulations induce an inflammatory response and seem to activate a Th1-biased immune response in moDCs.

The maturation of DCs is associated with the expression of cytokines and chemokines that induce and direct adaptive immune responses. The secretion of those mediators implicated in immune response was characterized by Luminex assay 24 h or 48 h after moDC transfection by formulations (**Figure 52**). Similar profiles were obtained after 24 h and 48 h of stimulation. The presence of gag mRNA in LAH4-L1-based formulations significantly increased the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, suggesting a direct impact of mRNA in the inflammatory response. More precisely, LAH4-L1/mRNA formulations induced the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL6, IFN- α , TNF- α), chemokines (MIP-1 β), Th1-related (IFN- γ , IL-12 (p70)) and Th2-related (IL-13, IL-7) cytokines. However, there was no significant increase in the amount of IL-4 and no secretion of IL-5 (not shown), two well-known markers of the Th2 response. In comparison, PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes gave a similar result but with a reduced inflammatory induction (lack of IL-6 and IFN- α) and a higher Th1 induction (IFN- γ , p-value < 0,01; IL-12 (p70), p-value < 0,001).

Résultats

Overall, these results indicate that LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA formulations are potential activators of pro-inflammatory responses and Th1-oriented immune responses, although a subset of Th2-specific markers are also induced.

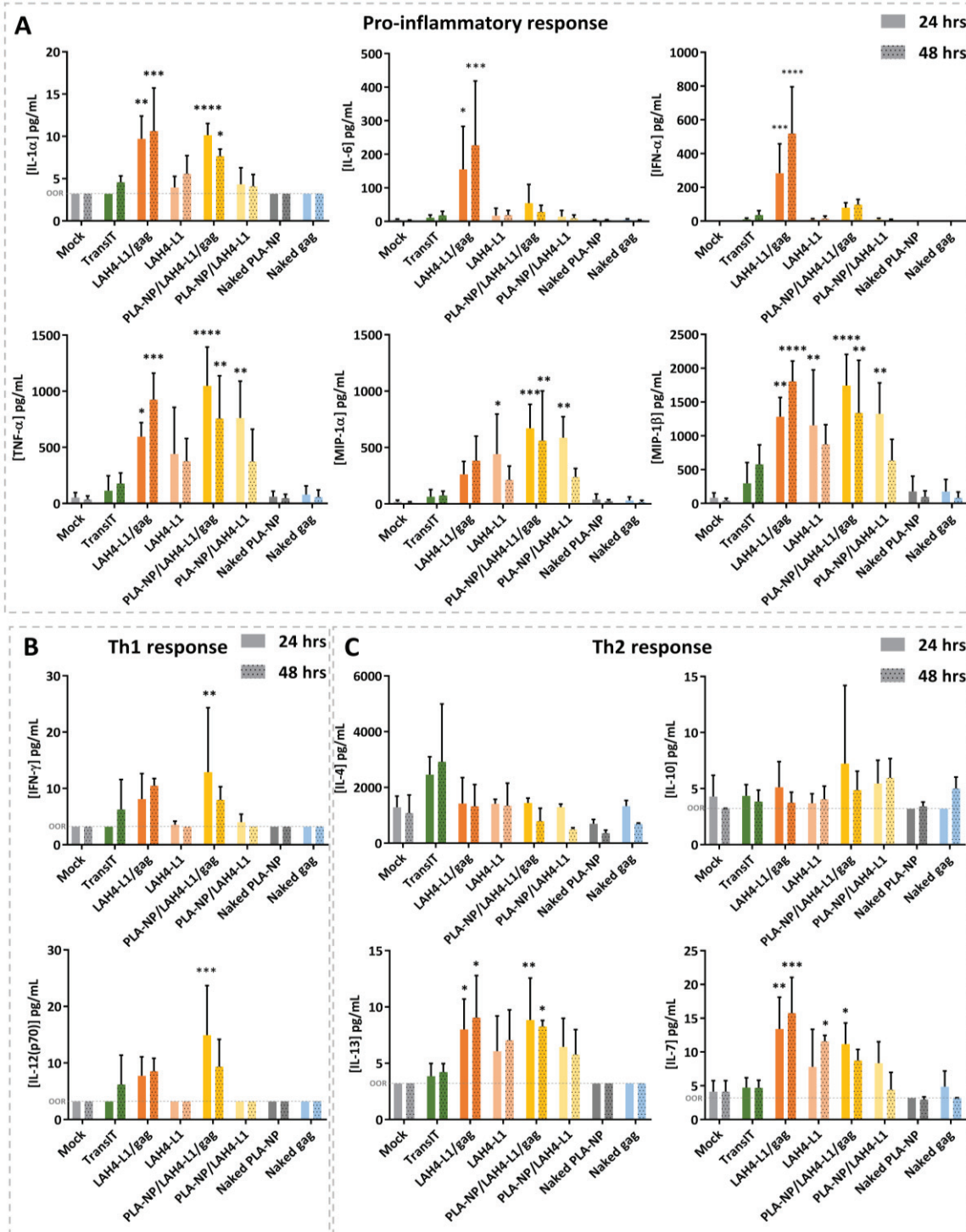


Figure 52: LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA promote cytokine and chemokine secretion by moDCs.

moDCs were stimulated by volume allowing the transfection of 660 ng of gag mRNA or equivalent volume for controls for 24 h or 48 h. The secretion of cytokines and chemokines involved in inflammatory processes (A), Th1 (B) or Th2 (C) immune responses was quantified by Luminex assay on CD1a⁺ CD14⁻ moDCs supernatants. Data represent the mean of three independent experiments performed with the supernatant of cells from three different patients, triplicate points being used in each experimental sample. OOR; Limit of detection (3.2 pg/mL). Statistical significance between two groups was determined using two-way Anova test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

4. Discussion

In recent years, antigen-encoding mRNAs have emerged as promising alternatives to classical vaccine approaches²³. The highest challenge with mRNA vaccine is the development of a safe and effective delivery system. Indeed, mRNAs are large polyanionic biomolecules that do not cross efficiently cell membrane barriers in their naked format and are generally unstable in blood circulation, at the site of injection and in the extracellular compartment due to the presence of RNases³⁷¹. While most studies in the mRNA vaccine field have focused on lipid nanoparticles (LNP)^{23,118,233,343}, we present here a novel platform to vectorize mRNA, using poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) and the amphipathic cationic peptide LAH4-L1, as an intermediate. These formulations allow effective *in vitro* uptake of mRNA by DCs, *via* clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis, and efficient mRNA expression, which depends on vacuolar proton ATPase activity and mRNA escape from endosomes. Moreover, these novel mRNA formulations induce DC activation and maturation, and trigger pro-inflammatory and Th1-biased immune responses.

PLA-NPs are versatile biodegradable platform, able to codeliver antigens and/or immunostimulatory molecules to DCs either *in vitro* or *in vivo*^{186,255}. However, due to their physicochemical properties, i.e. they are negatively charged, the vectorization of mRNAs using PLA-NPs has been a technological challenge. Thus, we have chosen to use cationic peptides as intermediates. RALA, LAH4 and LAH4-L1 are three cell penetrating peptides (CPPs) with amphipathic cationic properties, which have the ability to condensate nucleic acids^{151,339}. However, only few studies have used CPPs to deliver mRNAs^{352,363,366}. In this study, we have developed a strategy based on a two steps process (1) the formation of polyplexes between a cationic peptide and mRNAs and (2) their adsorption onto PLA-NPs (**Figure 46A**). The three peptides have shown an ability to condensate mRNAs in polyplexes (Peptide/mRNA), which can be adsorbed onto PLA-NPs to form stable nanocomplexes (PLA-NP/Peptide/mRNA) (**Figure 46B-D and S3**). However, only the LAH4-L1-based formulations have shown promising results for the induction of mRNA expression (**Figure 47**) and the potentiation of immune responses (**Figure 50-52**). The difference obtained between the three peptides might be partly explained by their structure (**Fig. S1**). Indeed, LAH4-L1, which is a LAH4 derivative, is a histidine-rich, cationic amphipathic peptide with pH-responsive properties. Sequence alignment of these two peptides reveals that two leucine and two histidine residues of LAH4 have been replaced by two histidines and two leucines in LAH4-L1, respectively. According to *in silico* modeling, the new location of the two histidine residues in the LAH4-L1 peptide narrows the angle subtended by the helix hydrophilic face to 80 degrees, instead

Résultats

of 100 degrees in LAH4. This may give this peptide an enhanced capacity in membrane disruption^{182,339}.

In this study, we also provided *in vitro* evidence that a low dose of mRNA present in LAH4-L1 and PLA-NP/LAH4-L1-based complexes can induce a strong protein expression in dendritic cells (DCs) (**Figure 47A-C'**). Moreover, *in vitro* efficiency of mRNA transfection and translation in DCs is significantly more important using these formulations than with TransIT (a commercially reagent) for the same mRNA doses. Although, we found that LAH4- and RALA-based mRNA complexes are unable to transfect DCs, others works have shown efficient transfection of DNA, siRNA and/or recently mRNA transfection using RALA, LAH4 and GALA CPPs in DCs and/or different cell lines^{149,151,152,339,363}. These differences may be explained by variations in the experimental conditions, especially regarding the amount of transfected mRNA. Indeed, for RALA-¹⁴⁹ and GALA-³⁶³ based polyplexes, the formulations contain 26- and 10-fold more RNA/cell, respectively, than in our study. Although LAH4-L1- and PLA-NP/LAH4-L1-based formulations were efficient for DC transfection and expression, they failed to induce mRNA expression in HEK293 and HeLa cells (**Figure 47C and F-G**). Since DCs are specialized in antigen capture and processing¹⁰⁰, the hydrodynamic diameter of LAH4-L1-based complexes might induce DC endocytosis and activation, in comparison to the two epithelial cell lines with a low endocytosis capacities. Hence, a low dose of transfected mRNA could be sufficient to detect its translation in DCs but not in epithelial cells in our assays.

The addition of PLA-NPs to LAH4-L1/mRNA polyplexes induced mRNA expression in a higher number of DCs and at a stronger level (**Figure 47D and S4**). We showed that in presence of PLA-NPs, the eGFP intensity curve presents a bi-phasic profile with an increase from 4 h to 16-24 h post transfection and a decrease after 24 h (**Figure 47D**). Using lipid-based formulations to transfect DC lines, Phua *et al.* have shown a biphasic expression kinetics with a rapid peak at 5-7 h, then a rapid decrease of transgene expression until 9 h, followed by gradual loss of expression¹⁶⁴. Moreover, with a low polydispersity index, nanocomplexes are monodisperse and present a zeta potential of +37,3 mV. Polyplexes present a higher polydispersity index testifying the presence of aggregates and a lower zeta potential (+25,0 mV). Nanocomplexes could force the membrane to bend around the vector and promote its internalization by endocytosis or phagocytosis: this is the wrapping phenomenon described and illustrated by Nel *et al.*¹¹². This model implies that the surface charge value, but also the size and shape of the material could directly influence the interaction of the material with the membranes and thus the uptake of NPs. This could in part explain why nanocomplexes that have a larger surface charge and a more homogeneous size than polyplexes are internalized more efficiently, leading to a more sustained expression in cells. A sustained mRNA expression obtained

Résultats

with PLA-NP/LAH4-L1-based formulations could be advantageous for vaccine applications as it could increase the amount of antigen processed by DCs and consequently immune responses.

Here, we report that LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA are taken up by DCs through clathrin-mediated endocytosis and phagocytosis (**Figure 48**). However, most lipid-based mRNA vaccines are predominantly internalized by micropinocytosis^{118,158,372}. It is now well-described that physicochemical properties of delivery systems (such as size, geometry and polydispersity index), but also target cells properties, influence immune recognition and uptake of vaccine by APCs^{111,186,373,374}. The particulate nature and the size of PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes, similar to many viruses, could enhance interaction of the vaccine formulations with cell membranes, promoting antigen delivery into cells. LAH4-L1/mRNA polyplexes seem to follow the same internalization mechanisms than PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes, which could partly be due to the presence of some aggregates in LAH4-L1/mRNA formulations (**Figure S2**).

After endocytosis, a pH gradient is established inside the endocytic vesicles, ranging from the least acid early endosomes (pH 6.5 - 6.8) to acidic lysosomes (pH 4.5). mRNAs need to reach the cytosolic compartment to be translated. Protonation of the histidine imidazole groups in LAH4-L1 plays an important role in the transfection process and more importantly for endosomal escape³³⁹. Indeed, the presence of the pH-responsive cell-penetrating peptide LAH4-L1 in vaccine formulations enhanced mRNA expression in a vacuolar proton ATPase-dependent mechanism (**Figure 49**), suggesting that LAH4-L1 promoted endosome membrane disruption in DCs for cytosolic delivery of nanocomplexes³⁶⁵. Following its release into the cytosol, mRNAs can be translated into antigenic protein. Both endosomal and cytosolic localization of mRNA may participate to their effect on immune responses, as we found that mRNA activates both endosomal (TLR3) and cytosolic (RIG-I) PRRs (**Figure 49**). mRNAs act as an adjuvant, stimulating the secretion of immune-stimulatory factors. For vaccination, the immune-stimulatory effect and the intrinsic-adjuvant activity of IVT mRNAs could be beneficial, but must be balanced and controlled in time, so that DC activation does not prevent the expression of the antigenic mRNAs supposed to stimulate adaptive immune responses. The activation of both innate and adaptive immune responses is needed for efficient vaccination. The results presented here suggest an ability of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes to activate both innate immunity, and a wide spectrum of adaptive immune responses markers (**Figure 51-52**). The adaptive response signature observed *in vitro* 6 h post transfection suggests that both MHC-I and MHC-II antigen presentation mechanisms are activated, with a prevalent Th1-oriented response and a lower Th2 counterpart (**Figure 51-52**). This indicates that LAH4-L1/mRNA polyplexes and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplexes may be suitable mRNA delivery vectors to induce cytotoxic responses in addition to humoral, which remains

Résultats

to be explored *in vivo*. We could observe that gene expression analysis and luminex assays were performed at specific time-points, which can influence some results of specific chemokines. Next step will be to perform the same type of analysis with a more complete kinetic for a longer period of time.

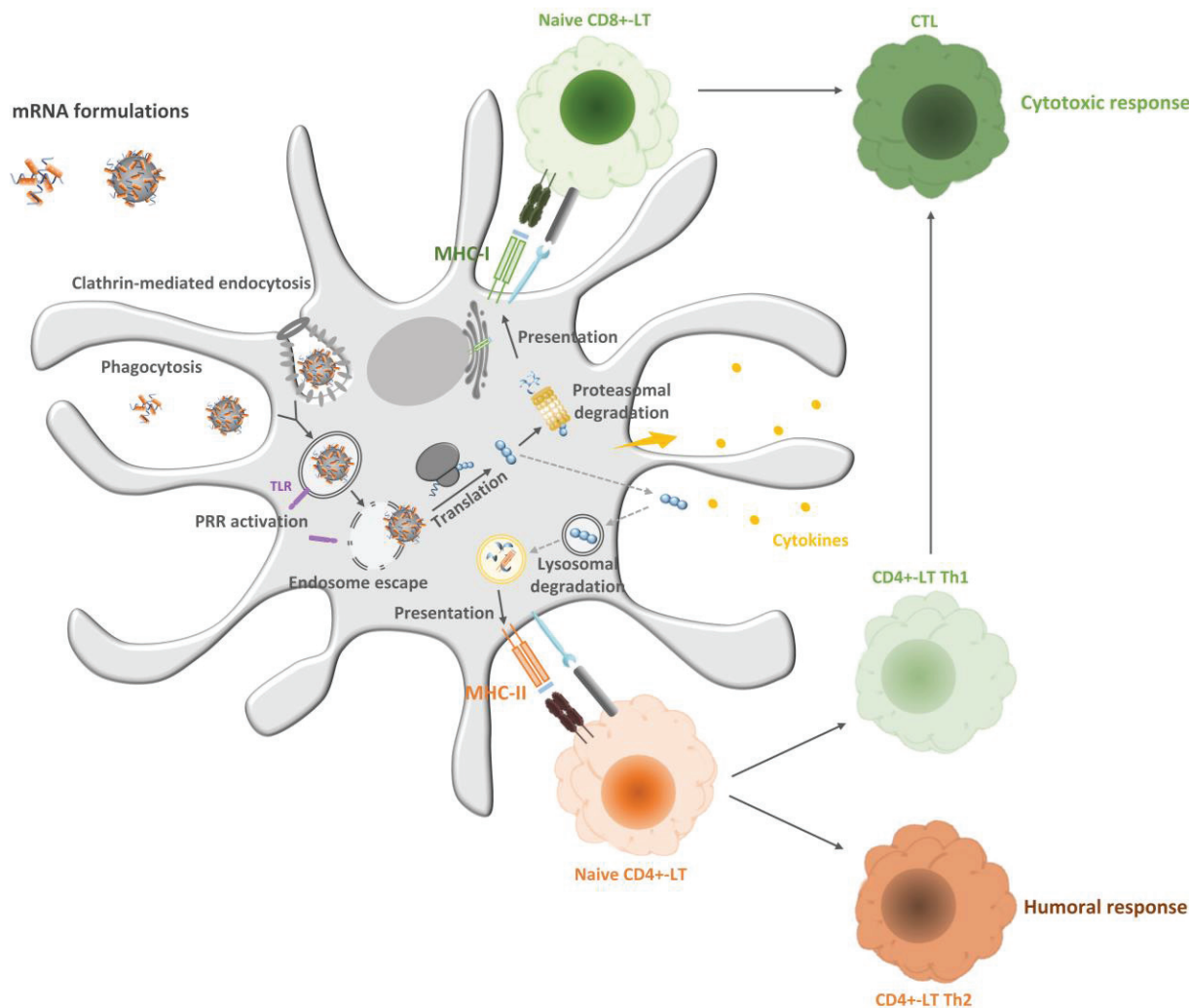


Figure 53: Model for trafficking of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA into DCs to induce immune responses.

Formulations are taken up by DCs via clathrin-mediated endocytosis or phagocytosis. In the endosomal compartment, LAH4-L1 peptides induce endosome escape and release of mRNA into the cytosol. The presence of mRNA in both endosome and cytosol trigger innate immune stimulation via PRRs. In the cytosol, mRNA is translated into an antigenic protein, which is subsequently processed by the proteasome, and presented onto Major Histocompatibility Complex-type I (MHC-I). This intracellular pathway leads to CD8⁺ T lymphocyte (LT) activation. Intracellular protein (and especially VLPs formed by gag antigen) can be released by DCs and taken up by novel immature DCs, degraded by lysosomes and presented onto MHC-II. This presentation leads to CD4⁺ T lymphocyte (LT) activation to form Th1 and Th2 LTs, involved in the activation of cytotoxic and humoral responses, respectively.

A hypothetical model explaining the different steps leading to cytotoxic and humoral responses after endocytosis of LAH4-L1-gag mRNA-based formulations into DCs is presented in **Figure 53**. In this scenario, after clathrin-mediated endocytosis or phagocytosis, endosome escape and mRNA translation, the gag protein can be processed and presented through MHC-I allowing T-CD8⁺ activation and CTL activation. During this period, mRNAs induce the activation of PRRs. The

Résultats

induction of CTLs is potentiated by DC activation and the production of Th1-associated cytokines. Gag expression could also induce vesicles-like particle (VLPs) formation, as described elsewhere²⁷⁰, which can be later released by DCs and taken up by immature DCs. Secreted VLPs which are recognized like extracellular pathogens, are then processed and presented onto MHC-II, allowing T-CD4⁺ activation. The generation of an antigen-specific CTL response is important for the development of effective antiviral or antitumor immune responses. Moreover, humoral response is essential to elicit antibodies and memory B cells. The signature of immune responses triggered in primary DCs *in vitro* by LAH4-L1-based gag mRNA formulations, suggests this strategy could be used to transfect human DCs in the case of *ex vivo* therapy, and especially in HIV-1 vaccine-based therapy of chronically infected patients^{232,375}. Indeed, by inducing a wide spectrum of both innate and adaptive immune response, this mRNA vaccine formulation would permit clearing the viral reservoir by eliminating infected cells leading to a potential HIV cure³¹⁵.

5. Conclusions

In this study, we have designed and developed new strategies to vectorize mRNA using PLA-NPs platform and LAH4-L1 amphipathic cationic peptides. We demonstrated a high capability of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA to transfect DCs and to induce strong protein expression. The presence of PLA-NPs in the formulations enhances this effect. mRNA nanoformulations trigger PRR activation and promote innate immunity activation. Moreover, these complexes could potentiate the humoral immune response, about also a prevalent Th1-biased aspect. Thus, PLA-NP/LAH4-L1/mRNA formulations are versatile platforms for efficient *in vitro* mRNA delivery to DCs, which could be applied to the *ex vivo* treatment of a wide variety of chronic infectious diseases, like HIV-1.

Conflict of interest

We declare no competing financial interest

Authors contributions

ALC participated in the conception and design of the study, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. CLG selected peptides and designed formulations. BV participated in the conception and design of the study. JYE, ED and BV assisted in data analysis, and wrote the manuscript. PMG performed uptake analysis and assisted in the moDC purification. CM performed FRET analysis. All the authors read, critiqued, and approved the final manuscript.

Résultats

Acknowledgements

We acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL): AniRA-Cytométrie platform, for assistance with flow cytometry and the PLATIM-Microscopie platform. We also acknowledge Simon Megy for its helps in bioinformatic analysis, and Guido Vanham for pGEM4z-HxB2-gag-64A plasmid and eGFP mRNA and Christophe Guillon for p17 antibody gifts.

Financial support

ALC was supported by a regional fellowship (ARC Santé / Région Auvergne Rhone-Alpes) for three years. Financial support is gained from ANRS in the framework of HIVERA JTC 2014 (HIV-NANOVA) and from ANR-16-CE20-0002-01 (FishRNAVax) to BV, ED and CLG.

Supplementary data

Table IX: Mode of action and working concentration of chemical inhibitor used.

Inhibitors	Endocytosis pathways inhibited	Mode of action	Working concentration	Ref
Genistein (Sigma-aldrich)	Caveolae-dependent endocytosis	Inhibits actin cytoskeleton	50 μ M	113,376
Chlorpromazine (Sigma-aldrich)	Clathrin-mediated endocytosis	Dissociation of clathrin and adaptator from plasma membrane	15 μ g/mL	113
Dynasore (Sigma-aldrich)	Caveolae and clathrin-dependent endocytosis	Inhibits dynamin	50 μ M	377
Nocodazole (Sigma-aldrich)	Caveolae and clathrin-dependent endocytosis	Blocks transport from early to late endosomes through inhibition of microtubules polymerization	1.25 μ g/mL	378
Amiloride (Sigma-aldrich)	Macropinocytosis	Inhibits the Na ⁺ /H ⁺ exchange protein	100 μ M	113,379
Pimozide (Sigma-aldrich)	Phagocytosis	Specific Ca ²⁺ /calmodulin inhibitor	10 μ M	380
Cytochalasin D (Sigma-aldrich)	Macropinocytosis and phagocytosis	Potent inhibitor of actin polymerization	10 μ M	113

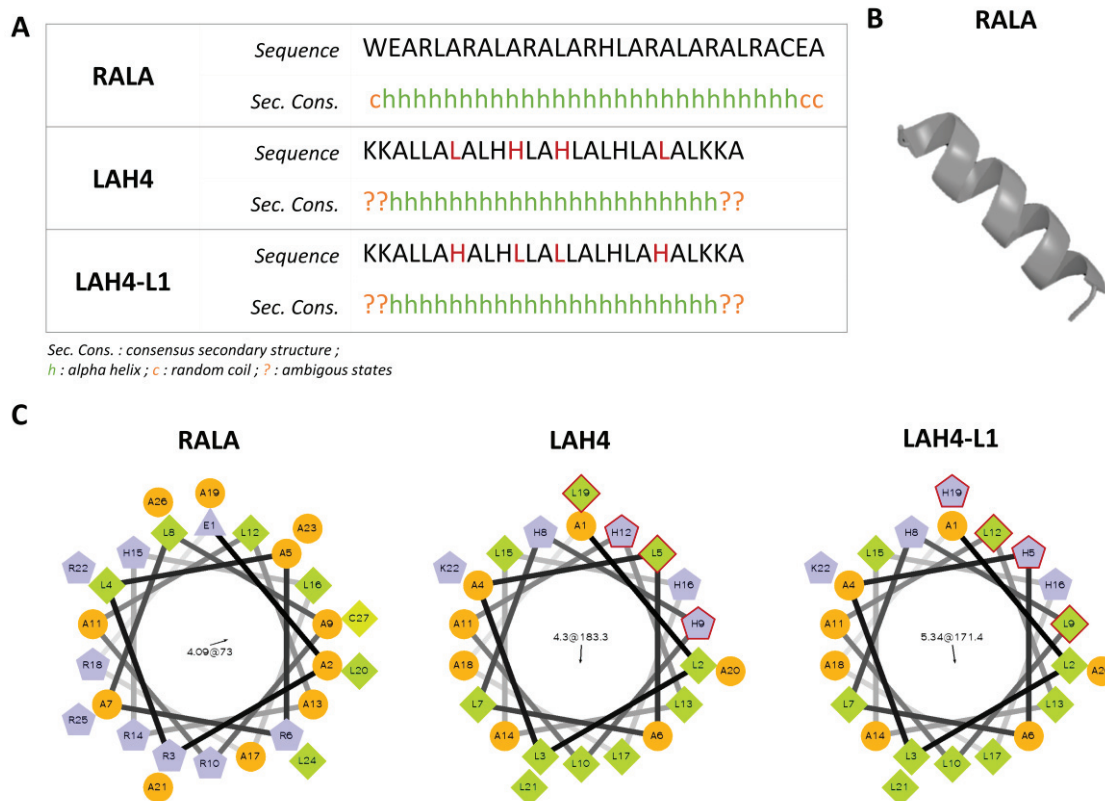


Figure S1: Sequence and predictive structure of RALA, LAH4 and LAH4-L1 peptides.

(A) Sequence and secondary structure of RALA, LAH4 and LAH4-L1, based on NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) interactive web server using 9 predictions³⁸¹. In green (h) was represented the predicted alpha helix structure and in orange (c) the random coil. Question mark (?) represent ambiguous state. Modified amino acids between LAH4 and LAH4-L1 sequence are red. (B) Representation of RALA structure in alpha helix (rzlab.com) (C) Helical wheel projection of RALA, LAH4 and LAH4-L1. The output represents the hydrophilic residues as circles, hydrophobic residues as diamonds, potentially negatively charged amino acids as triangles, and potentially positively charged residues as pentagons. Hydrophobicity is color coded as well: hydrophobic residue is green and hydrophilic residues are coded orange. The potentially charged residues are light blue. Modified amino acids between LAH4 and LAH4-L1 sequence are outlined in red.

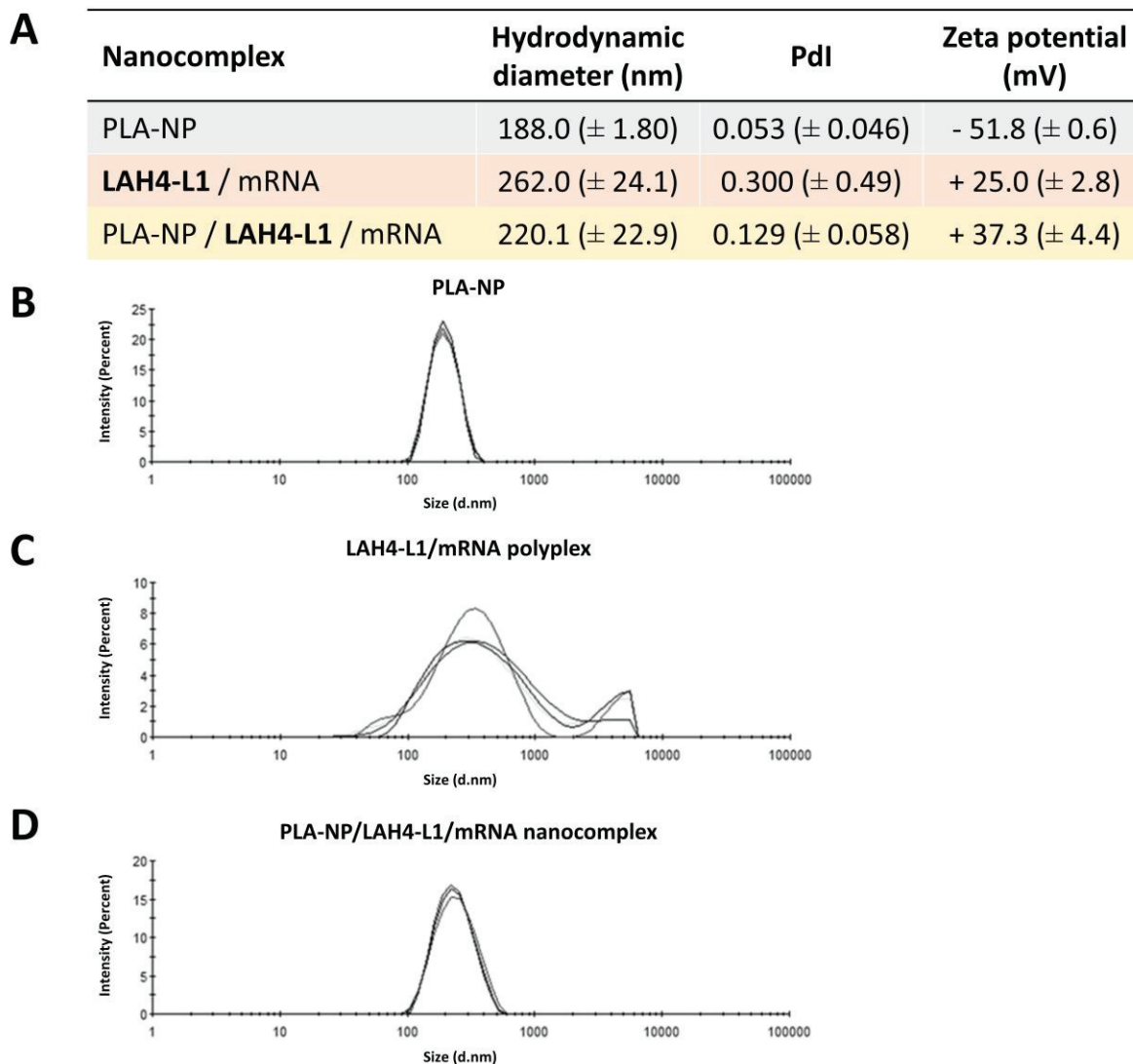


Figure S2: Characterization of LAH4-L1/mRNA and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA by DLS.

(A) Evaluation of PLA-NP (in grey), LAH4-L1/mRNA (in orange) and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA (in yellow) hydrodynamic diameter, polydispersity index (Pdl) and zeta potential. Each value provided is the average of four series of measurements in five independent experiments (N=5). (B-D) Graphs represent the size distribution by intensity of the four measurements obtained in one representative experiment for Naked PLA-NP (B), LAH4-L1/mRNA polyplex (C) and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA nanocomplex (D), respectively.

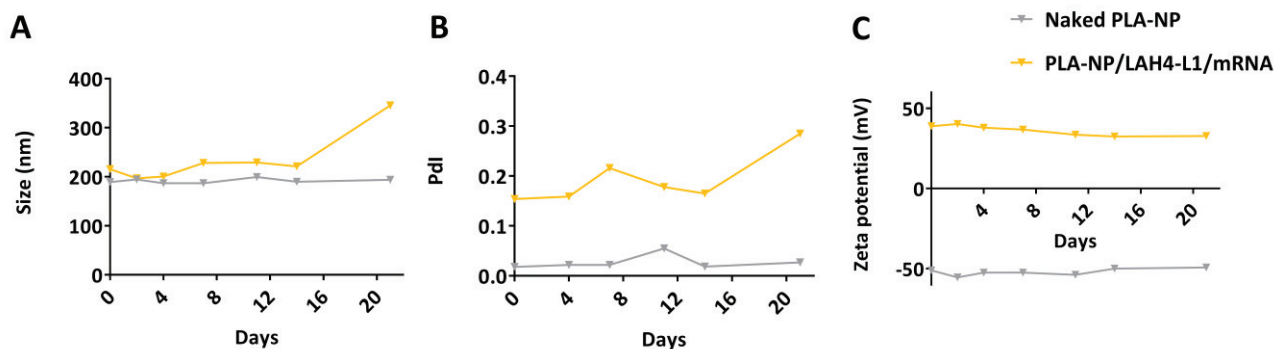


Figure S3: Stability of PLA-NP/LAH4-L1/mRNA formulation at 4°C over 21 days.

Evaluation of PLA-NP (in grey) and PLA-NP/LAH4-L1/mRNA (in yellow) hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (Pdl) (B) and surface charge (C) over 21 days at 4°C. Each value provided is the average of four series of measurements.

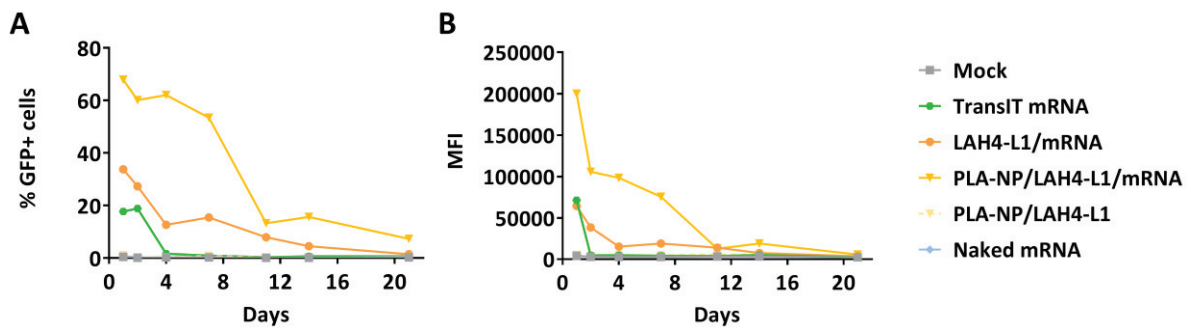


Figure S4: LAH4-L1 formulations retain ability to induce efficient mRNA expression in DCs after conservation at 4°C for up to 7 days.

Formulations were performed at day 0 and conserved at 4°C during 21 days. At each time point, untreated DCs (Mock), TransIT mRNA (positive control), mRNA complexes and negative controls (PLA-NP/LAH4-L1 and naked mRNA) were transfected in serum-free medium for 4 hours (20 ng mRNA/well), and the transfection efficiency was measured after 16h. (A) Percentage of green fluorescent protein (eGFP) positive DC2.4 cells (B) mean fluorescence intensity (MFI).

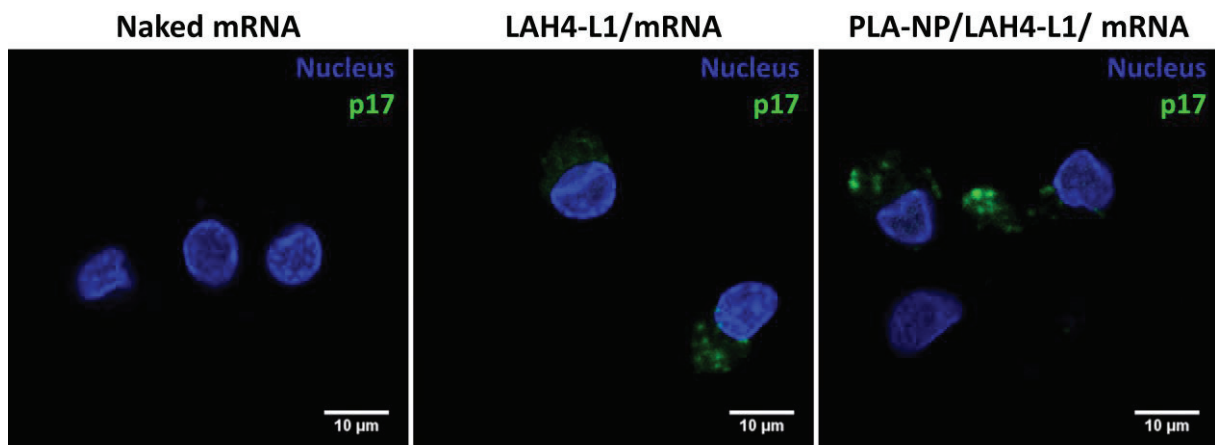


Figure S5: Expression of gag mRNA in moDCs.

Gag mRNAs, either naked or complexed in LAH4-L1-based formulations, were transfected into moDCs in serum-free medium during 4 hours (20 ng mRNA/well). An immunostaining of p17 protein, a component of gag polyprotein, was performed after 16 h. p17 is in green (FITC) and nuclei, in blue (DAPI).

Données complémentaires non-publiées

g. Les ARNm sont exprimés dans les moDC de manière moins efficace que dans les DC2.4.

Afin d'évaluer l'efficacité de traduction des ARNm dans les moDC, des transfections ont été effectuées dans des conditions similaires à celles réalisées avec les cellules DC2.4. Chaque complexe contenant 20 ng d'ARNm eGFP a été mis en contact des moDC pendant 4h dans du milieu sans sérum. Le pourcentage de cellules GFP positives et l'intensité moyenne de fluorescence ont été évalués par cytométrie en flux après 16 h (Figure S6). Tout d'abord, nous pouvons observer que l'efficacité de traduction des ARNm dans les cellules moDC est inférieure à celle observée dans les DC2.4. En effet, que ce soit suite à la transfection par le TransIT, les polyplexes ou les nanocomplexes, la quantité de cellules GFP positives et l'intensité de fluorescence sont inférieures

Résultats

dans ces cellules primaires. De plus, bien que la quantité de cellules présentant une expression de eGFP soit significativement plus importante suite à la transfection par le nanocomplexes (p -value < 0,01), l'intensité de fluorescence reste elle très faible.

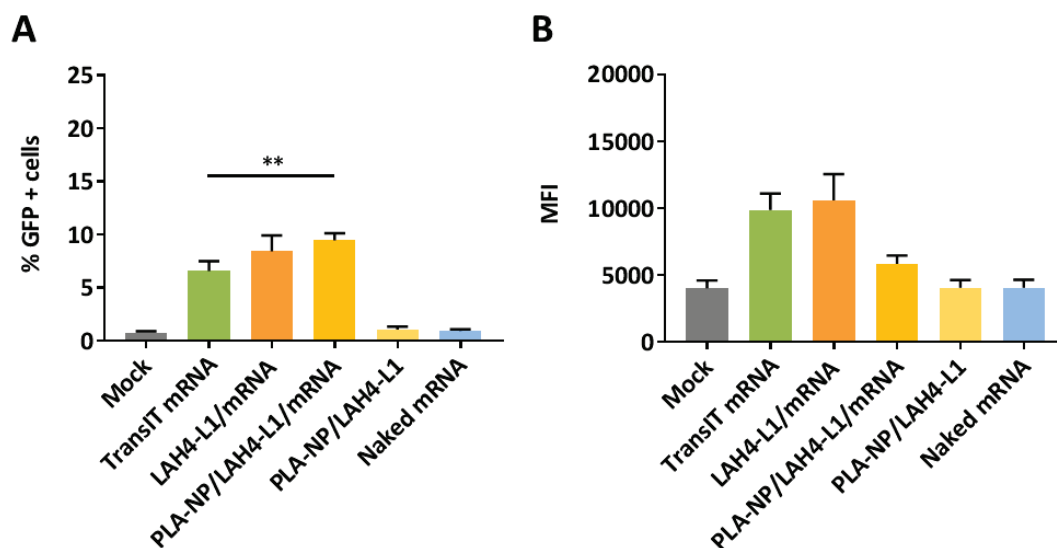


Figure S6 : Les polyplexes et les nanocomplexes induisent une faible expression dans les moDC.

Les moDC non traitées (Mock), transfectées avec l'ARNm couplé au Trans IT (contrôle positif de transfection) ou aux formulations et les contrôles négatifs (PLA-NP/LAH4L1 et ARNm seul) ont été transfectées dans du milieu sans sérum pendant 4 h avec des volumes permettant la transfection de différentes quantités d'ARNm ou équivalents pour les contrôles ou de 20 ng pour 25000 cellules. Le pourcentage de cellules exprimant la protéine eGFP (green fluorescent protein) (A) et l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) (B) sont présentés après 16 h de transfection. La différence statistique entre deux groupes a été déterminée en utilisant un test Anova one-way : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

h. Les formulations présentent une toxicité à forte dose

Dans le but d'analyser la cytotoxicité des formulations obtenues avec les trois peptides à doses plus élevées, nous avons transfecté les cellules DC2.4 avec les polyplexes et nanocomplexes à doses croissantes et la cytotoxicité a été mesurée à 24 h. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois peptides (RALA, LAH4 et LAH4-L1) comme en attestent les profils de cytotoxicité identiques (**Figure S7A**). Nous avons remarqué que l'augmentation des quantités de formulations corrént avec une augmentation de la cytotoxicité, quel que soit le peptide utilisé. De plus, l'ajout des NP-PLA induit une augmentation de l'effet cytotoxique (voir Peptide vs PLA-NP/peptide et Peptide/ARNm vs PLA-NP/Peptide/ARNm). Cette augmentation de la cytotoxicité est due à un nombre trop important de nanoparticules par quantité de cellules³⁷⁰. C'est pourquoi, dans l'ensemble de cette étude, nous nous sommes placés à une quantité d'ARNm de 20 ng pour 25 000 cellules, correspondant à une quantité de 30 000 NP-PLA par cellule (**Figure S7B**). Cette quantité n'induit pas de cytotoxicité des cellules.

Résultats

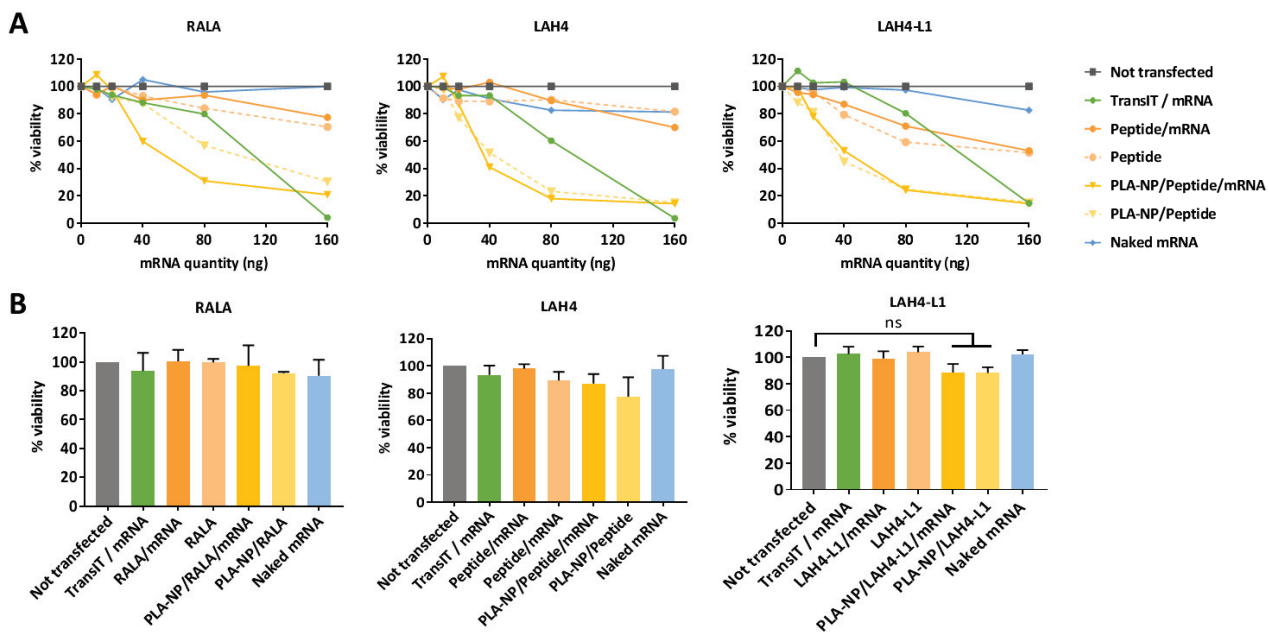


Figure S7: La cytotoxicité des formulations composées des peptides RALA, LAH4 et LAH4-L1 est proportionnelle à la concentration.

Cytotoxicité des formulations basée sur l'utilisation des peptides RALA, LAH4 et LAH4-L1 dans les cellules dendritiques DC2.4. Les DC non traitées (not transfected), transfectées avec l'ARNm couplé au TransIT (contrôle positif de transfection) ou aux formulations et les contrôles négatifs (NP-PLA/peptide, peptide seul et ARNm seul) ont été transfectées dans du milieu sans sérum pendant 4 h avec des volumes permettant la transfection de différentes quantités d'ARNm ou équivalents pour les contrôles (A) ou de 20 ng pour 25000 cellules (B). La cytotoxicité a été mesurée après 16 h en utilisant le test Presto-blue. Les cellules non transfectées ont été ramenées à 100 %.

III. MISE EN PLACE DES OUTILS POUR L'ANALYSE *IN VIVO*

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés au potentiel de ces formulations pour une application *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons testé certains paramètres pouvant influencer sur la prise en charge *in vivo*, tels que l'expression des complexes en présence de sérum et la protection des formulations au contact du sérum. De plus, nous avons testé la cytotoxicité des formulations sur des embryons et larves de poisson zèbre. Enfin, nous avons testé la fonctionnalité des formulations suite à des injections directes sur des larves de poisson zèbre.

Dans un second temps, nous avons mis en place les outils pour une prochaine expérimentation *in vivo* chez la souris. Pour cela, un projet d'étude validé par un comité d'éthique a été écrit.

1. Evaluation de paramètres influant sur la prise en charge des formulations pour une application *in vivo*

1. Introduction

Dans les parties précédentes, une nouvelle stratégie de vectorisation a été développée. Cette formulation est basée sur l'utilisation du LAH4-L1, un peptide cationique amphipathique, comme intermédiaire entre les ARNm et les NP-PLA. Des polyplexes formés de LAH4-L1/ARNm ont été adsorbés à la surface des NP-PLA aboutissant à la formation de nanocomplexes. Ces formulations ont montré un intérêt particulier pour transférer des cellules dendritiques (DC) *in vitro*, induire une expression efficace de l'ARNm dans ces cellules, et activer les réponses immunitaires *in vitro* sur modèles de DC primaires. Ces nouvelles plateformes vaccinales peuvent ainsi être utilisées pour transférer des DC dans le cas de thérapies *ex vivo*. Ces thérapies sont basées sur la purification de cellules de patients, leur activation *ex vivo* par transfection avec des formulations vaccinales et leur ré-administration chez ce même patient. Cette approche est ainsi nécessairement personnalisée.

Cependant, dans la suite de ce travail, nous souhaitons analyser le potentiel de ces formulations vaccinales pour l'induction de réponse suite à des injections directes *in vivo*. Cette stratégie de vaccination est en effet moins coûteuse et invasive que les thérapies *ex vivo*^{23,101}. De plus, la fonctionnalité des formulations suite à l'injection directe pourrait permettre d'évaluer la capacité d'induction de réponses immunitaires *in vivo* chez les souris par nos formulations.

Résultats

L'objectif de cette partie porte sur l'analyse de paramètres pouvant influencer l'efficacité des polyplexes LAH4-L1/ARNm et des nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm *in vivo*. Pour cela, nous avons testé la fonctionnalité des formulations en présence de sérum et évalué la capacité protectrice des complexes. Enfin, nous avons analysé la toxicité des formulations sur des embryons de poisson zèbre. Ce Vertébré de petite taille est transparent à l'état larvaire facilitant l'analyse par imagerie. Enfin, il présente un système immunitaire comparable à celui des Vertébrés, avec des cellules phagocytaires présentes dès le 2ème jour post-fécondation. Il constitue donc un modèle immunocompétent de choix, complémentaire au modèle cellulaire.

Les analyses de cytotoxicité obtenues sur les embryons de poisson zèbre ont été réalisées avec l'aide de Laetitia Vachez.

2. Matériels et méthodes

a. Production des ARNm

L'ARNm codant pour une protéine eGFP stabilisée a été produit et fourni par l'équipe du Pr Guido Vanham (Université d'Anvers, Belgique). La qualité des ARNm a été vérifiée sur gel d'agarose.

b. Formation des complexes

Le peptide LAH4-L1 utilisé a pour séquence : KKALLAHALHLLALLALHLAHALKKA (GeneScript, Chine). Pour former les complexes, l'ARNm a été dilué dans de l'eau dépourvue en RNase à 40 ng/ μ L et mélangé volume à volume avec 800 ng/ μ L de peptide LAH4-L1 en eau. Ensuite, ces polyplexes ont été mélangés volume à volume aux NP-PLA (à 0,5 % en eau, Adjuvatis, France) pour former les nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm.

c. Quantification de l'expression de l'ARNm

La lignée cellulaire immortalisée DC2.4 (une lignée cellulaire de cellules dendritiques³³²) a été cultivée dans du milieu de culture RPMI-1640 supplémenté par 10 % de sérum de vœu fœtal (SVF ou FBS), 10 mM d'Hépès et 50 μ M de β -mercaptoéthanol (Gibco, Life Technologies, France) à 37°C et 5 % de CO₂. Les cellules HeLa (ATCC® CCL-2™) and HEK293(ATCC® CRL-1573™) ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 10 % de sérum de vœu fœtal (SVF ou FBS) à 37°C et 5 % de CO₂.

Un jour avant la transfection, 25000 cellules/puit ont étéensemencées dans une plaque 96-puits dans un volume de 100 μ L final. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé par 100 μ L de milieu frais contenant du sérum. Les formulations ont ensuite été ajoutées pour permettre la

Résultats

transfection d'un volume équivalent à 20 ng / d'ARNm eGFP ou un volume équivalent pour les contrôles. Les cellules ont été incubées pendant 20 h à 37 °C et en présence de 5 % de CO₂. Un contrôle positif de transfection a été réalisé en utilisant le kit de transfection Trans IT®-mRNA Transfection Kit (Mirus, Euromedex, France) selon les recommandations du fournisseur. Des contrôles négatifs ont été réalisés avec le peptide LAH4-L1 seul, les complexes NP-PLA/LAH4-L1, les NP-PLA libres et les ARNm libres à des concentrations équivalentes à celles utilisées dans les complexes.

Pour quantifier le pourcentage de cellules eGFP positives et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI), les cellules transfectées ont été détachées, marquées à l'iodure de propidium (Invitrogen) et analysées par cytométrie en flux en utilisant l'AccuriC6 (BD Biosciences) sur la plateforme AnirRa-Cytométrie (SFR BioSciences, UMS3444/CNRS). Les cellules mortes marquées à l'iodure de propidium ont été exclues, et les cellules vivantes d'intérêt ont été sélectionnées en fonction de leur profil FSC et SSC pour éliminer les débris cellulaires. Les données ont été analysées sur le logiciel BD AccuriC6 Software CFlow Plus (BD Biosciences). Les données représentent la moyenne des données obtenues pour trois expériences indépendantes.

d. Analyse de la protection des ARNm

Pour analyser la capacité protectrice des formulations, un test de mobilité électrophorétique sur gel (EMSA) a été réalisé.

Pour chaque complexe formulé, un volume correspondant à 200 ng d'ARNm ou un volume équivalent pour les contrôles a été incubé en absence ou en présence de 10 % de sérum de vœu fœtal (SVF) décomplémenté et filtré (Gibco, Life technologies, France) pendant 10, 30 ou 60 min à 37°C et 5 % de CO₂. Chaque condition a été réalisée en duplicata. Dans un des deux duplicatas, un traitement à l'héparine et à la protéinase K a été réalisé pour séparer l'ARNm des complexes. Brièvement, les complexes ont été traités d'abord avec l'héparine (Sigma, France) pendant 1 h à température ambiante, puis à la protéinase K (NEB, France) à 56°C pendant 30 min. Chaque échantillon traité ou non traité contenant 200 ng d'ARNm a été chargé dans un puit de gel agarose à 1 % en présence de bromure d'éthidium (Genesee Scientific). La migration a été effectuée à 100 mV pendant 20 min dans du tampon TBE 1X (Euromedex).

e. Analyse de la cytotoxicité sur les embryons de poisson zèbre :

Les expériences ont été réalisées sur des poissons sauvages (AB/TU). Le maintien des lignées et la collecte des embryons ont été réalisés à l'animalerie PRECI (Plateau de Recherche

Résultats

Expérimentale en Criblage *In Vivo*; SFR Biosciences, UMS3444/CNRS). Les poissons ont été gardés à une température de 28°C et une durée d'éclairage de 14h par jour.

Les tests de toxicité sont basés sur l'essai n°236 des « lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques », ainsi que sur les travaux de Beekhuijzen *et al.* pour le calcul des scores. Pour tester la cytotoxicité, des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) fécondés depuis moins de 4 h ont été immergés dans 100 µl de milieu E3 1X contenant la formulation à tester dans une plaque 96-puits (1 embryon par puit). Pour chaque condition, 8 embryons ont été analysés. Pour chaque formulation, 4 quantités d'ARNm différentes ont été testées : 7,5, 15, 30 et 60 ng d'ARN final par puit. La cytotoxicité a été observée à 24 h en analysant individuellement chaque embryon à la loupe. La viabilité des embryons a été quantifiée et le développement des embryons a été suivi. Un contrôle négatif a été réalisé en immergeant les embryons dans une solution de milieu E3 1X (milieu de croissance des embryons) et un témoin positif a été réalisé en utilisant le 3,4 dichloroaniline (3,4 DCA, Sigma Aldrich) à une concentration de 8 µg/mL. Les embryons ont été imagés au microscope à fluorescence inversée Nikon TiE sur la plateforme PRIMATISS (SFR Biosciences, UMS3444/CNRS) à l'objectif 10X. Une procédure identique a été appliquée sur des larves de 24 heures. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Image J.

f. Analyse de la fonctionnalité après injection chez la larve de poisson zèbre

Les expériences ont été réalisées sur des larves de poisson zèbre issues d'une souche casper³⁴⁷. Le maintien des lignées et la collecte des embryons ont été réalisés à l'animalerie PRECI. Les micro-injections ont été réalisées sur des larves de 15 jours en utilisant un micro-injecteur FemtoJet (Eppendorf ; plateforme PRECI), permettant la délivrance de 10 nL par micro-capillarité (100 ng/µL) d'ARNm. Les formulations ont été préparées comme décrits ci-dessus avec un ARNm eGFP (Trilink). Après 24 h, les larves ont été anesthésiées à la Tricaine (100 mg/L, Sigma). La fluorescence au niveau des sites d'injections a été analysée par microscopie inversée (Nikon TiE ; plateforme PRIMATISS) à l'objectif 10 X. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Image J. Six larves par conditions ont été injectées et analysées. Les expériences ont été réalisées en accord avec les directives européenne et la loi française, et le protocole a été validé par un comité d'éthique local (CECCAPP n° 2017010321395486).

g. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism Version 6.0. Toutes les données représentent la moyenne ± SEM. La différence entre deux groupes a été analysée comme décrit dans la légende des figures. La significativité des données est indiquée dans les figures.

3. Résultats

a. Les formulations en présence de sérum ne permettent pas l'expression de l'ARNm

L'injection directe *in vivo* des formulations dans des modèles animaux nécessite une fonctionnalité de ces dernières en présence de sérum. Pour analyser la capacité des formulations à induire une expression de l'ARNm vectorisé en présence de sérum, deux lignées cellulaires épithéliales (HEK293 et HeLa) et une lignée de cellules dendritiques (DC2.4) ont été transfectées avec les formulations dans du milieu complémenté de sérum (Figure 54).

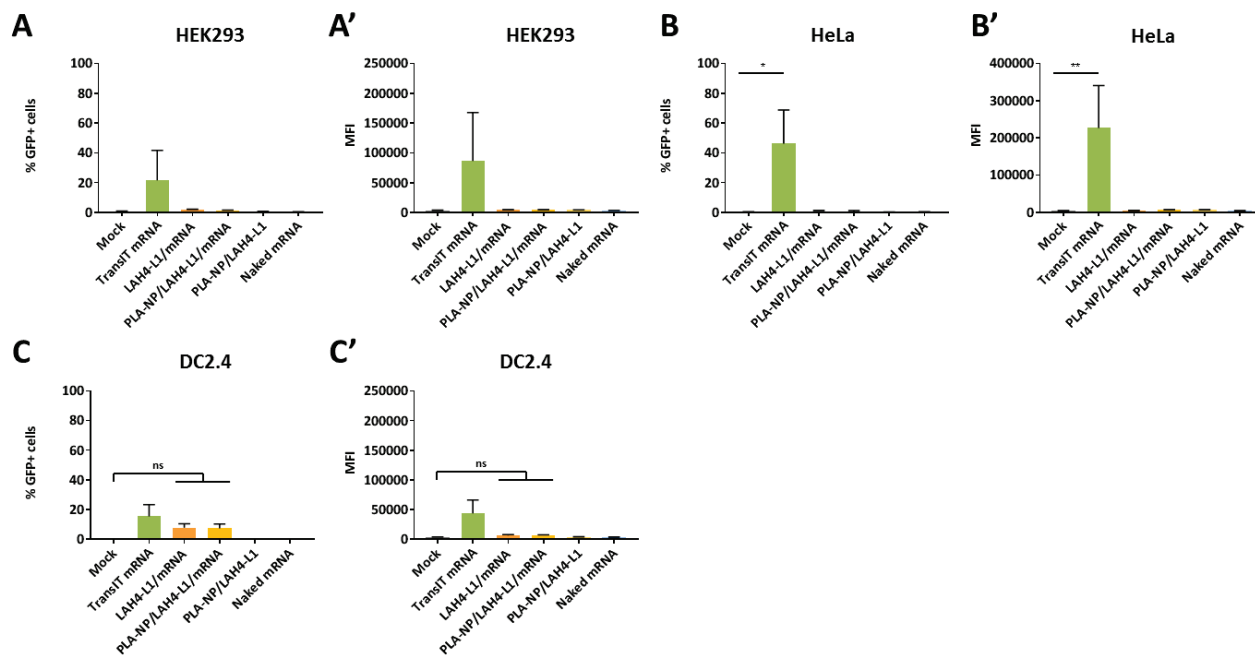


Figure 54 : Les formulations basées sur l'utilisation de LAH4-L1 ne sont pas fonctionnelles en présence de sérum.

Les cellules non traitées (Mock), transfectées avec l'ARNm eGFP couplé au TransIT (contrôle positif), ou aux formulations et les contrôles négatifs (PLA-NP/LAH4-L1 et ARNm nu) ont été transfectées dans du milieu supplémenté en sérum pendant 4 h (20 ng d'ARNm/puits). L'efficacité de transfection a été mesurée 16 h après la transfection. Le pourcentage de cellules eGFP positives (% GFP + cells) et la moyenne de fluorescence (MFI) dans les cellules (A) HEK293, (B) HeLa et (C) DC2.4 ont été quantifiés par cytométrie en flux. La différence statistique entre deux groupes a été déterminée en utilisant un test Anova one-way : *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Alors que la transfection de l'ARNm dans la solution commerciale contrôle (Trans IT) a conduit à une expression efficace dans les trois modèles cellulaires, aucune expression n'a été détectée lors de la transfection par les polyplexes LAH4-L1/ARNm et les nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm. En effet, le nombre de cellules eGFP positives (%GFP + cells) ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ne sont pas modifiés dans les cellules HEK293 et HeLa et ne sont pas significativement différents des contrôles négatifs (Mock) dans les cellules DC2.4. Ces données suggèrent une absence d'efficacité des formulations dans ces trois modèles cellulaires *in vitro*, en présence de sérum.

Résultats

traitement, toutes les liaisons sont altérées et l'ARNm migre dans le gel comme l'ARNm libre. En absence de traitement au sérum (FBS -), nous avons pu remarquer que les ARNm complexés aux formulations (conditions 1 et 2) migrent à la même distance que l'ARNm libre (condition 3) et montrent un profil similaire, attestant de leur intégrité. Cependant, en présence de 10 % de sérum (FBS +), nous pouvons voir que les ARNm libres et complexés sont dégradés dès une incubation de 10 min. Bien que les polyplexes et les nanocomplexes retardent légèrement la dégradation (voir profil obtenu à 10 min vs 30 min), les formulations basées sur l'adsorption des ARNm à la surface des NP-PLA ne suffisent pas à protéger ces biomolécules.

c. Le LAH4-L1 induit une toxicité sur les embryons de poisson zèbre et une mortalité à forte dose chez les larves

Pour appliquer ces formulations aux études *in vivo*, ces dernières doivent être exemptées de toute toxicité. Dans le but d'analyser ce paramètre, nous avons utilisé un protocole mis au point au sein de l'équipe basé sur l'utilisation d'embryons de poisson zèbre. La manipulation de cet organisme modèle ne nécessite pas d'autorisation d'expérimentation animale jusqu'à 5 jours de développement (inclus), un stade au-delà duquel la larve commence à se nourrir. Pour analyser la toxicité, des embryons de poisson zèbre, deux approches ont été réalisées en parallèle. Dans la première approche, les analyses ont été effectuées sur des embryons fécondés depuis moins de 4 h et en présence du chorion, afin de voir un éventuel effet sur l'éclosion des embryons. Dans la deuxième approche, l'étude a été faite sur des larves de poisson zèbre de 24 heures dépourvues de leur chorion pour s'affranchir d'un éventuel effet protecteur de cette structure. Dans les deux cas, les embryons ou larves ont été immergés dans une solution comprenant les formulations à différentes concentrations et le développement de l'embryon a été analysé pendant 24 h. Pour chaque condition, 8 embryons ont été observés et une image représentative est présentée. La viabilité des embryons à 24 h est indiquée sur chaque image.

Dans le cas de la première approche, si la formulation n'induit pas de toxicité, l'embryon va se développer correctement et un profil identique à celui obtenu dans le contrôle (Mock) va être observé (**Figure 56A**). Au contraire, si les formulations présentent une certaine toxicité, le développement de l'embryon va être ralenti, altéré ou même stoppé. Par exemple, en présence de 3,4 dichloroaniline (3,4 DCA), une drogue affectant le développement, nous avons pu observer la présence de cellules isolées (**Figure 56B**). Le développement de l'embryon a été altéré par la drogue et les cellules ont été dégradées. La viabilité des embryons à 24 h est de 0 %. En présence des polyplexes et des nanocomplexes, nous avons observé que le développement et la viabilité des embryons sont fortement affectés, même à faible concentration (**Figure 56C**). Cette toxicité semble

Résultats

induite par le LAH4-L1. En effet, le peptide seul induit les mêmes résultats alors que les NP-PLA seules ne sont pas toxiques. Ces données suggèrent une toxicité des formulations comportant le LAH4-L1 dans ce modèle, avant même l'éclosion de l'embryon.

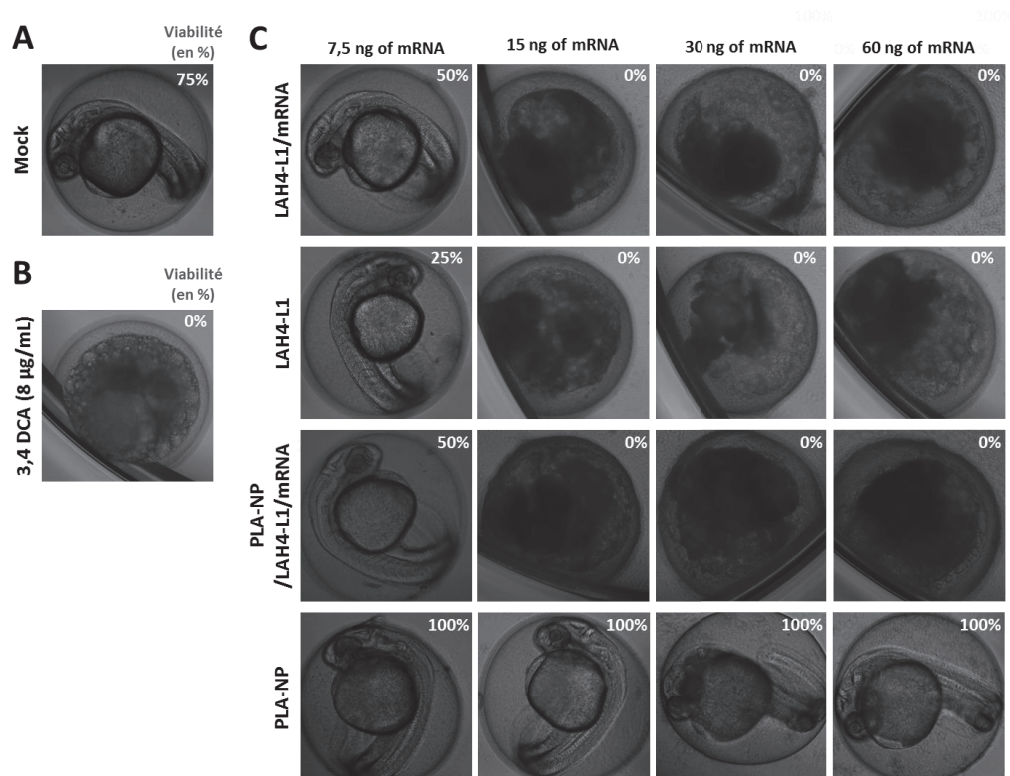


Figure 56 : Le LAH4-L1 présent dans les formulations induit un arrêt de développement et une mortalité sur les embryons de poisson zèbre après 24 h d'immersion.

Images des embryons de poisson zèbre à 24 h en présence de milieu de culture E3 (Mock) (A), de 3,4 dichloroaniline (3,4 DCA) à une concentration de 8 µg/mL (B) ou de l'une des formulations à différentes quantités d'ARNm ou des équivalents pour les contrôles (C). Une image représentative des 8 embryons testés est présentée pour chaque condition. La viabilité des embryons pour chaque condition est inscrite sur chaque image.

Cependant, le LAH4-L1, un agent perturbateur des membranes, peut entraîner la formation de pores dans le chorion, entraînant l'entrée massive de composants présents dans le milieu de croissance et/ou issus des formulations. La présence de LAH4-L1 sur les cellules en division peut conduire à cette toxicité. Il est donc possible que la toxicité soit due à la propriété pénétrante du LAH4-L1.

Dans une deuxième approche, l'expérience a été répétée sur des larves de 24 heures dépourvues de leur chorion. Les larves ont été immergées dans une solution comportant une quantité de LAH4-L1 déterminée. Le développement correct des larves et leur viabilité ont été analysés après 24 h d'immersion (Figure 57). Nous avons pu remarquer que le peptide LAH4-L1 induit une mortalité chez les larves à partir de 30 ng d'ARNm par puit. En effet, la viabilité des embryons est de 25 % et 50 % pour les quantités d'ARNm égales à 30 et 60 ng / puit respectivement. Malgré cette mortalité, nous avons remarqué que le développement des embryons viables n'est pas affecté par la présence du LAH4-L1. De plus, au deux plus faibles doses d'ARNm, aucun impact du LAH4-L1 n'a

Résultats

été observé sur les 8 larves immergées. Le LAH4-L1 semble donc induire une toxicité limitée sur des organismes déjà formés à faible dose.

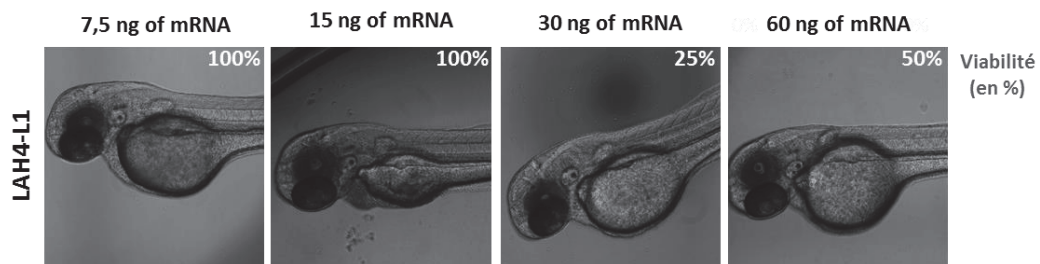


Figure 57 : Le LAH4-L1 induit une mortalité limitée, sans altération du développement, sur les larves de poisson zèbre après immersion pendant 24 h.

Images de larves de poisson zèbre de 48 h en présence de LAH4-L1 à différentes quantités. Une image représentative des 8 embryons testés est présentée pour chaque dose. La viabilité des embryons pour chaque condition est inscrite sur chaque image.

d. Les formulations basées sur l'utilisation de LAH4-L1 ne permettent pas l'expression de l'ARNm vectorisé chez les larves de poisson zèbre

Dans une dernière partie, nous avons analysé la fonctionnalité des polyplexes et des nanocomplexes suite à des injections en intramusculaire sur des larves de poisson zèbre âgées de 15 jours (Figure 58A-B).

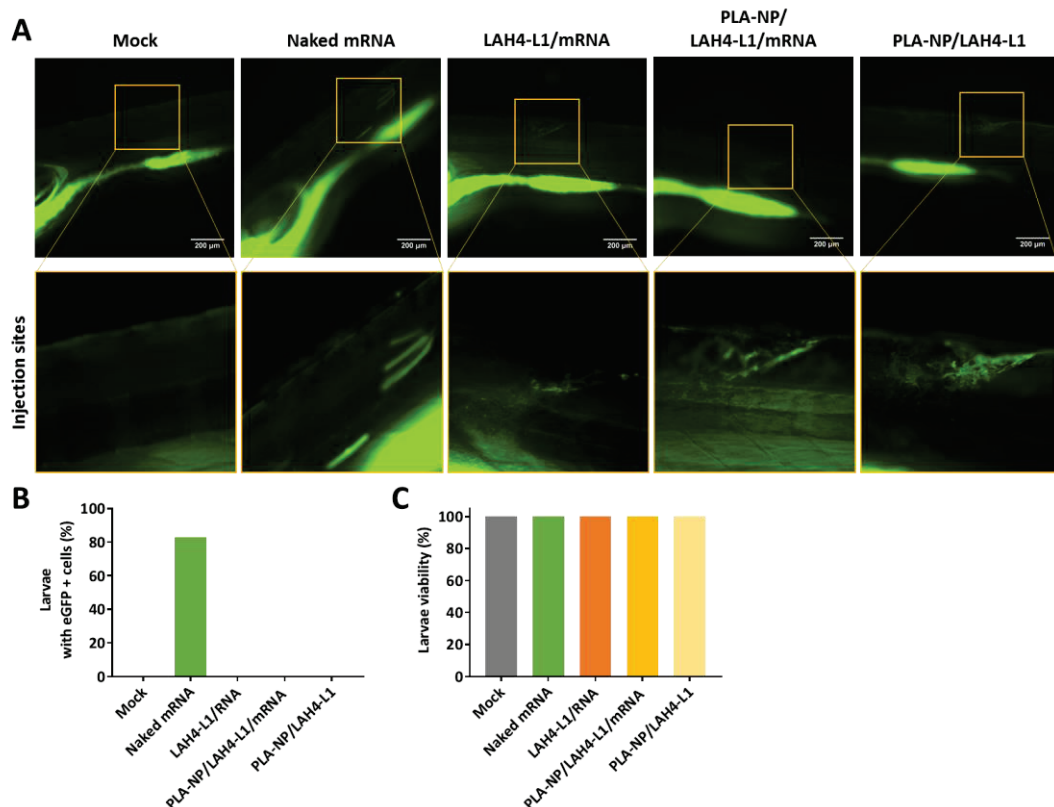


Figure 58 : Les ARNm vectorisés par les polyplexes et les nanocomplexes ne permettent pas l'expression des ARNm chez des larves de poisson zèbre.

(A) Images de larves de poisson zèbre de 15 jours suite à des injections de 100 ng d'ARNm (ou équivalent pour les contrôles) en intramusculaire. Une image représentative des 6 larves injectées est présentée. La zone d'injection (encadrée en jaune) est agrandie dans l'image du dessous. La fluorescence verte dans l'intestin de la larve correspond à de l'auto-fluorescence. (B) Pourcentage de larves exprimant des cellules fluorescentes dans la zone d'injection. (C) Viabilité des larves 24 heures après l'injection.

Résultats

Nous avons pu observer que seules les larves ayant été injectées avec l'ARNm libres ont exprimées ce dernier dans les cellules musculaires. En effet, 83 % des larves présentent des cellules fluorescentes au niveau du site d'injection. Cependant, avec les polyplexes et les nanocomplexes, une absence de fluorescence, synonyme d'une absence de fonctionnalité des complexes dans ces conditions, a été observée. Nous pouvons tout de même noter que l'injection des formulations chez les larves de 15 jours n'induit pas de mortalité (**Figure 58C**).

4. Discussions

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au potentiel des formulations basées sur l'utilisation du LAH4-L1 pour une application *in vivo*. En effet, dans la suite de ce projet, nous souhaitons analyser l'intérêt des formulations dans l'induction de réponses immunitaires chez les souris après injections en sous-cutanée. Pour cela, les formulations doivent être fonctionnelles dans un environnement comprenant du sérum et être exemptées de toute toxicité.

Dans un premier temps, nous avons analysé la fonctionnalité des formulations basées sur l'utilisation de LAH4-L1 dans du milieu complété en sérum. Nous avons pu observer que les polyplexes LAH4-L1/ARNm et les nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm ne permettent pas d'induire une expression significative de l'ARNm eGFP dans trois types cellulaires (HEK293, HeLa et DC2.4) en présence de sérum. Dans la section précédente, nous avons observé un avantage particulier de ces formats de délivrance pour le ciblage des DC et l'induction d'une expression forte des transgènes. Afin de comprendre l'impact du sérum sur la fonctionnalité des ARNm vectorisés, un test de protection au sérum a été réalisé. Nous avons pu voir que l'ARNm présent dans les polyplexes et adsorbé à la surface des NP-PLA n'est pas protégé en présence de sérum. Le sérum comporte des enzymes de dégradation des ARNm, les RNAses, qui sont également présentes au niveau des tissus, et notamment au niveau sous-cutané, site d'injection prévu dans ce projet³⁸². Une équipe a montré que la présence de RNasin[®], un inhibiteur de protéase naturel, permet de protéger les ARNm des dégradations par les RNAses. Le traitement des sites d'injection avec des inhibiteurs de protéases et l'ajout de RNasin[®] dans les formulations peut prévenir la dégradation par les RNases au niveau des sites d'injection³⁸². Il pourrait donc être intéressant de répéter l'expérience de protection en ajoutant dans les formulations le RNasin[®].

Dans une deuxième partie, la toxicité associée aux formulations a été analysée dans un modèle de poisson zèbre, un Vertébré de petite taille au développement rapide. Nous avons pu remarquer que contrairement aux résultats obtenus sur les DC *in vitro*, les embryons de poisson zèbre sont sensibles aux formulations comportant le LAH4-L1. Cette toxicité n'est pas induite par les NP-PLA qui, seules, n'affectent pas le développement et la viabilité des embryons. Comme décrit précédemment, cette

Résultats

toxicité peut être induite par la propriété pénétrante du peptide LAH4-L1 qui entraîne la formation de pores dans les membranes, une activité néfaste aux premiers stades de développement. Sur des larves de poisson zèbre de 24 h, la toxicité est plus modérée et apparaît à partir d'un volume équivalent à l'ajout de 30 ng d'ARNm dans 100 μ L (soit une concentration de LAH4-L1 de 6 ng/ μ L). Ensemble, ces données montrent un effet toxique des polyplexes et nanocomplexes induit par la présence du peptide LAH4-L1 à partir d'une concentration de 6 ng/ μ L. Cet effet est proportionnel à la quantité de peptide et au stade de développement du modèle animal.

Dans une dernière partie, la fonctionnalité des formulations a été testée sur des larves de poisson zèbre de 15 jours. Suite à des administrations en intramusculaire, nous avons pu voir que les polyplexes et les nanocomplexes formés à partir de LAH4-L1 ne permettent pas d'induire l'expression des ARNm dans ces conditions. Cependant, nous pouvons noter que la prise en charge de ces complexes est optimale par les cellules dendritiques. Pour cibler ces cellules dendritiques, il est préférable de réaliser des injections au niveau sous-cutané. La réalisation d'analyses suite à des injections sous-cutanées dans un modèle souris pourra nous apporter plus d'informations quant à la fonctionnalité des ARNm ainsi vectorisés *in vivo*. De plus, il est important de noter que la nature de cellules phagocytaires ciblées est potentiellement très différente entre les poissons zèbres et les souris. Bien que des cellules phagocytaires présentatrices d'antigènes (macrophages) soient déjà présentes dans des jeunes larves de poisson, ces tests d'injection pourraient être tentés à un stade un peu plus tardif, après l'apparition de DC³⁸³. De plus, l'échelle de l'organisme étant très différente, les volumes injectables sont beaucoup plus petits chez la larve de poisson, ce qui ne permet que de potentiellement toucher petit nombre de cellules. Le poisson zèbre est un modèle avantageux pour les approches d'imagerie, cependant le passage au modèle souris est nécessaire dans la suite de ce projet.

Dans de prochaines études, il pourrait être intéressant d'éliminer l'excès de LAH4-L1 des formulations, par centrifugation douce sur filtre de taille adaptée. Bien que cet excès soit nécessaire au fonctionnement des formulations *in vitro*, il peut induire une toxicité et affecter la prise en charge *in vivo*. En outre, l'encapsulation des polyplexes et nanocomplexes dans une bicouche lipidique pourrait également être une stratégie prometteuse pour permettre la protection des ARNm vectorisés. En effet la présence de cette couronne permettrait de prévenir des dégradations, de favoriser le relargage direct des polyplexes et nanocomplexes dans le cytoplasme des cellules *via* la fusion des lipides avec la membrane plasmique, et de diminuer la cytotoxicité induite par la formation de pores dans les membranes.

Pour conclure, nous avons pu voir dans cette partie que des ajustements sont nécessaires pour pouvoir appliquer les polyplexes et les nanocomplexes *in vivo* chez la souris.

2. Projet expérimental pour l'évaluation de l'intérêt des formulations chez les souris dans le cas de la protéine gag

Au cours des dernières années, notre équipe s'est tournée vers le développement de vaccins à ARN messenger, une stratégie prometteuse pour lutter contre des maladies infectieuses tel que le VIH-1. Nous avons mis au point une méthode de formulation permettant de vectoriser les ARNm sur les NP de PLA, par utilisation d'un intermédiaire peptidique cationique, le LAH4-L1. Ces formulations ont été testées *in vitro* sur des cellules dendritiques primaires issus de sang humain. En présence des formulations vaccinales utilisant les NP-PLA et le LAH4-L1, ces cellules spécialisées dans l'induction de réponse immunitaire ont été activées. Ce résultat prometteur nous incite maintenant à évaluer la capacité d'induction de réponse immunitaire de ces vaccins nanoparticulaires à ARNm *in vivo* dans le cas d'une vaccination anti-VIH-1.

Dans ce projet, un ARNm modèle gag codant pour la polyprotéine antigénique correspondante composée des protéines p24, p17 et p7 du VIH-1 a été utilisée. Cette polyprotéine, intervenant dans l'infection par le VIH-1, présente plusieurs avantages dans le cadre du développement de vaccins.

En effet, cette protéine a la capacité de s'auto-assembler et de bourgeonner à la surface des membranes pour former des pseudo-particules virales ou VLP (*Virus-Like Particles*)³⁸⁴ (**Figure 59**). Par cette capacité à produire à la fois des protéines intracellulaires et des VLP relarguées dans le milieu extracellulaire, cet ARNm peut permettre l'induction non seulement d'une réponse cellulaire, avec l'activation des lymphocytes T-CD8, mais également humorale, avec production d'anticorps et de cellules mémoires. Dans le cadre du VIH-1, cette réponse à large spectre permettrait une diminution de la charge virale des patients atteints par le virus, par la réponse cellulaire, tout en protégeant ces derniers sur le long terme, par la réponse humorale.

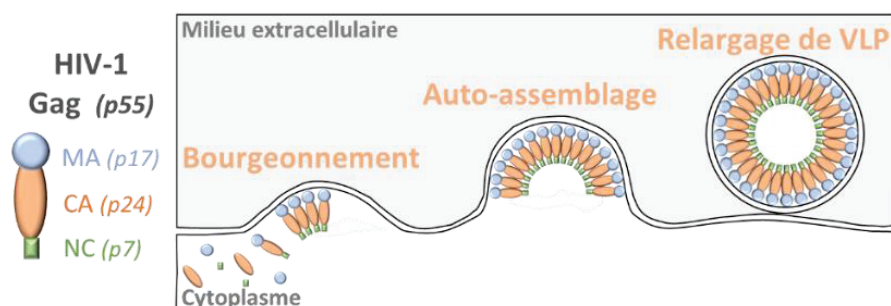


Figure 59 : Structure de la protéine gag du VIH-1 et mécanisme de l'auto-assemblage en pseudo-particules virales (VLP).

De plus, il a récemment été montré la cross-réactivité de la protéine p17 (composante de gag) avec un anticorps anti-gp41 du VIH-1, protéine de l'enveloppe du VIH-1³⁸⁵. Cette activité est possible lorsque la protéine p17 porte un site de reconnaissance particulier (que l'on nommera AS).

Résultats

Des vecteurs contenant ces mutations ont été produits au sein de l'équipe et la fonctionnalité des ARNm gag a été vérifiée par immunofluorescence et western-blot (données non montrées).

L'objectif de ce projet va par la suite consister à tester :

- (1) L'intérêt de nos formulations de nanoparticules de PLA / ARNm pour l'induction de réponses immunitaires. Pour ce faire, nous comparons les vecteurs mis au point précédemment avec des vecteurs d'ARNm commerciaux.
- (2) L'intérêt de notre ARNm modèle formant des VLP pour l'induction de réponses immunitaires humorale, mais surtout cytotoxique. Pour ce faire, un ARNm modèle modifié (noté VLP-), ayant perdu la capacité à former des VLP, a été produit et sera testé en parallèle de l'ARNm de base (noté WT).
- (3) L'intérêt de notre ARNm pour l'induction d'une réponse immunitaire anti-gp41. Pour cela, des mutations au niveau du site d'interaction AS ont été réalisées dans les séquences permettant la synthèse des ARNm.

Cette partie représente la perspective principale de ce projet de thèse et les procédures liées à sa réalisation ont été validées par un comité d'éthique (CECAPP). Ce projet se découpe en 4 procédures qui sont décrites succinctement ci-dessous (**Figure 60**).

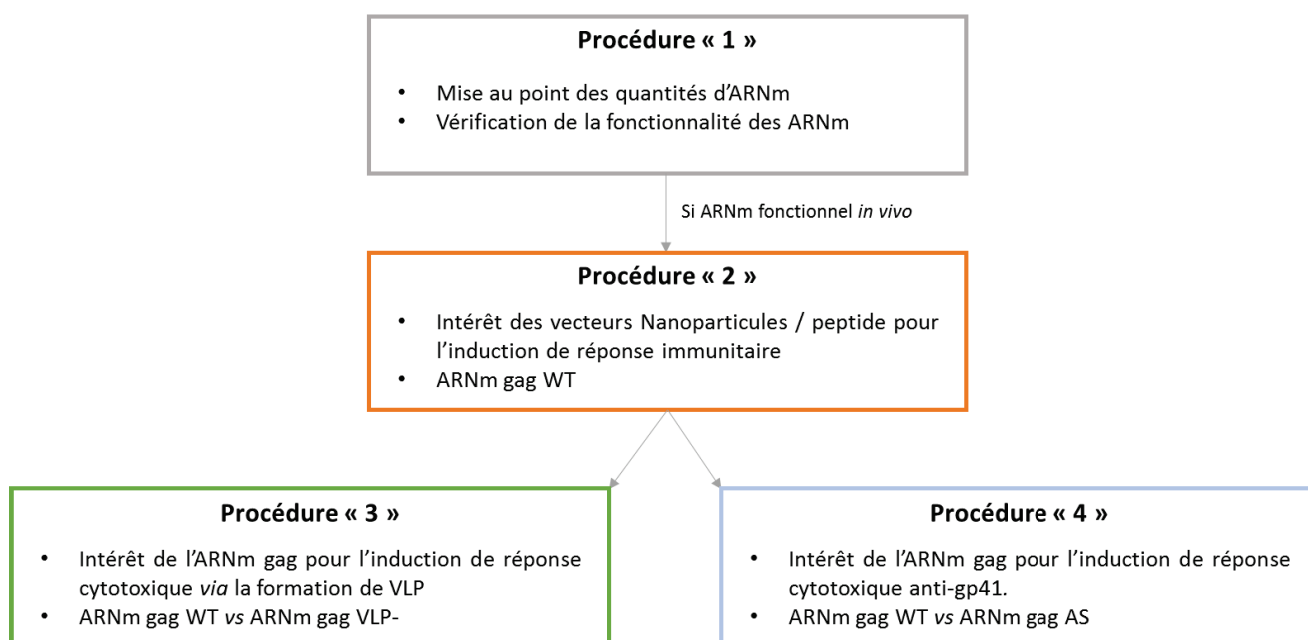


Figure 60 : Organisation des procédures pour l'étude *in vivo* chez les souris.

Procédure 1 : Détermination des conditions d'expérimentation

Une analyse de la dose optimale nécessaire à l'expression de la protéine antigénique dans les souris modèles sera réalisée. Pour cela, un ARNm sera injecté à différentes doses en sous-cutané avec un vecteur commercial (contrôle positif des procédures suivantes) chez des souris CB6F1. Après 24h (temps nécessaire à la traduction en protéine), les souris seront mises à mort et des fragments

Résultats

tissulaires (peau, ganglions drainants ou muscles) seront prélevés pour des analyses histochimiques et immunologiques.

Ensuite la fonctionnalité des 4 ARNm modèles de l'étude sera vérifiée à la dose optimale. Comme pour l'étape précédente, des injections par voie sous-cutanée seront faites dans des souris CB6F1 et la fonctionnalité des ARNm dans les tissus entourant le site d'injection sera analysée 24h après.

Les ARNm fonctionnels au site d'injection et dans les ganglions drainants *in vivo* seront ensuite utilisés pour des tests d'immunogénicité dans les procédures (2), (3) et (4).

Pour les procédures (2), (3) et (4) du projet, les tests seront réalisés par injection sous-cutanée des NP/ARNm dans les souris. 3 injections seront réalisées à 3 semaines d'intervalle, selon un protocole décrit par Knudsen *et al.*³⁸⁶. La réponse immunitaire humorale (dosage d'IgG et d'IgM) sera analysée sur des prélèvements de sang et dans les muqueuses. Un des buts des vaccins à ARNm étant l'induction d'une réponse cellulaire, l'analyse cytotoxique anti-p24 sera évaluée par ELISPOT et cytométrie en flux après marquage des cytokines intracellulaires. De plus, un prélèvement des organes d'intérêt sera réalisé après la mise à mort des animaux (foie, rate, ganglions) pour des expérimentations d'histologie et d'immunohistochimie.

Procédure 2 : Intérêt des formulations basée sur l'utilisation du LAH4-L1 pour l'induction de réponses immunitaires.

Les polyplexes et nanocomplexes mis au point dans ce projet seront comparés à un vecteur commercial connu et efficace pour la délivrance d'ARNm *in vivo*.

Procédure 3 : Intérêt de l'ARNm modèle gag pour l'induction de réponses immunitaires.

Les ARNm gag WT ou muté pour la capacité à former les VLP seront comparés en utilisant les vecteurs d'intérêts.

Procédure 4 : Intérêt de l'ARNm gag pour l'induction d'une réponse immunitaire anti-gp41.

Les ARNm gag WT ou muté pour la capacité donner une réponse anti-gp41 seront comparés en utilisant les vecteurs d'intérêts

Dans ces trois procédures, pour déterminer l'efficacité de nos formulations, 3 critères seront utilisés : (1) basé sur la littérature et l'expérience du laboratoire, (2) basé sur l'intensité de la réponse immunitaire et (3) basé sur l'absence d'effets secondaires dû à nos formulations (augmentation de la température corporelle et perte de poids).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse avaient pour objectif principal (1) de concevoir et développer des formulations vaccinales à ARNm basées sur l'utilisation de nanoparticules de poly(acide lactique) (NP-PLA), (2) de caractériser l'efficacité de ces formulations pour la transfection *in vitro* de cellules dendritiques (DC) et (3) d'évaluer l'intérêt de ces formulations dans l'activation des réponses immunitaires.

Les propriétés physico-chimiques associées aux ARNm et aux NP-PLA font du développement d'une stratégie de vectorisation un réel défi technologique. Dans ce travail, nous avons évalué diverses méthodes de vectorisation aboutissant au développement d'une stratégie prometteuse. Dans cette dernière, les ARNm ont été condensés à l'aide d'un peptide cationique amphipathique, le LAH4-L1, permettant la formation de polyplexe qui ont ensuite été adsorbés à la surface des NP-PLA pour former des nanocomplexes. L'intérêt des polyplexes LAH4-L1/ARNm et des nanocomplexes PLA-NP/LAH4-L1/ARNm pour le ciblage, la prise en charge et l'activation de cellules dendritiques a ensuite été analysé.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence de nombreux facteurs influençant les mécanismes extracellulaires et intracellulaires aboutissant à l'activation du système immunitaire.

1. Influence de la stratégie de vectorisation pour la délivrance des ARNm par les NP-PLA

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à développer une nouvelle plateforme de vectorisation des ARNm par utilisation des NP-PLA. Pour vectoriser ces biomolécules par les nanoparticules élaborées dans l'équipe, nous avons testé trois approches majeures : (1) l'encapsulation des ARNm dans le cœur des NP-PLA et l'adsorption des ARNm à la surface des NP-PLA en exploitant les avantages (2) d'une interaction spécifique (peptide Rev – séquence d'ARNm RRE) ou (3) par l'utilisation d'intermédiaires cationiques. De nombreuses différences ont été observées quant à l'utilisation de chacune des stratégies (**Tableau X**).

Alors que l'encapsulation n'a pas permis de vectoriser les ARNm, l'adsorption de ces biomolécules à la surface des NP-PLA s'est révélée possible par l'intermédiaire du peptide Rev ou de peptides cationiques. L'ajout de la séquence spécifique d'ARN RRE dans la région 3' non-traduite de notre ARNm de référence, nous a permis de développer une stratégie basée sur l'adsorption *via* l'interaction avec le peptide Rev et la signature nucléique RRE. Dans cette stratégie, le pré-complexe ARNm-RRE/peptide Rev a ensuite été adsorbé à la surface des NP-PLA. Malgré la formation d'un pré-complexe ARN stable et son adsorption efficace sur les NP-PLA, aucune expression de l'ARNm n'a pu être détectée après transfection. De plus, des tests réalisés avec un ARNm dépourvu de la

Discussion générale et perspectives

séquence RRE ont montré des problèmes liés à la spécificité dans l'interaction du peptide Rev avec les séquences ribonucléiques, dans nos conditions expérimentales. Pour utiliser cette stratégie, des ajustements devront être réalisés, notamment pour vérifier la spécificité d'interaction en utilisant des ARN de transfert, mais ce travail pourrait constituer l'objet d'un projet à part entière.

Dans une dernière stratégie, nous avons pu montrer que l'utilisation d'intermédiaires cationiques est très prometteuse pour associer les ARNm aux NP-PLA, comme présenté précédemment (Coolen *et al.*, manuscrit soumis à Biomaterials). L'obtention d'un intermédiaire cationique capable de transférer efficacement des cellules dendritiques, de les activer et d'induire une réponse immunitaire a été le fil rouge de ces dernières années de thèse. L'ensemble des données obtenues avec ces différents intermédiaires cationiques est présenté en **Tableau X**. Comme nous allons voir, certains résultats négatifs pourraient résulter des conditions expérimentales et du type d'ARNm utilisés au moment de l'étude. Une homogénéisation des procédures semble donc importante pour pouvoir comparer correctement les différents intermédiaires cationiques. Il pourrait notamment être intéressant d'analyser l'expression de l'ARNm vectorisé par la poly-L-lysine en absence de sérum dans les cellules DC2.4. En effet, dans les études réalisées avec la poly-L-lysine, nous avons obtenu une faible expression de l'ARNm, mais non significative, en présence de sérum dans les cellules SRDC, un modèle de DC de souris, une expression dans des embryons de poisson zèbre *in vivo* et une toxicité réduite. Ces données font de ce vecteur un intermédiaire prometteur. De plus, la poly-L-lysine a montré des résultats intéressants pour la vectorisation d'ARNm avec l'induction d'une expression des ARNm supérieure à celle observée avec des formulations à base de DOTAP¹⁴⁸.

Tableau X : Comparaison des résultats obtenus avec les différentes stratégies de vectorisation.

	Encapsulation	Adsorption						
		Peptide Rev / ARN RRE	Poly-L- Lysine	DGL	Protamine	RALA	LAH4	LAH4- LI
Condensation de l'ARNm	-	+	+	+	+	+	+	+
Adsorption sur les NP-PLA	-	+	+	+	+	+	+	+
Expression dans les DC	Sérum +	-	+/-	-	-	-	-	-
	Sérum -	-	ND	ND	ND	-	+/-	++
Expression dans les embryons de poisson zèbre	ND	ND	+	-	-	++	+	-
Expression chez la larve de poisson zèbre	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-
Cytotoxicité <i>in vitro</i>	ND	ND	-	ND	ND	-	-	-
Cytotoxicité <i>in vivo</i>	ND	ND	ND	++	ND	ND	ND	+

ND : non déterminé

Au cours de ce travail, trois peptides amphipathiques cationiques ayant été décrits pour la vectorisation d'acides nucléiques ont été testés^{149,152,339,387}. Cependant, seul le peptide LAH4-L1 a montré un intérêt pour l'expression de l'ARNm vectorisé *in vitro* par les DC et l'activation de réponses immunitaires. Comme décrit dans la discussion de l'article (partie II des résultats), les

Discussion générale et perspectives

différences obtenues entre nos travaux et ceux obtenus par d'autres groupes peuvent être expliquées par des variations dans les protocoles de formulations et d'utilisation (ratios peptides/ARNm différents, quantités transfectées variées, présence de sérum...) ^{149,151,152,339,363}. Par exemple, il a été montré qu'avec une quantité d'ARNm 26 fois plus importante que dans notre étude, le peptide RALA associé à un ARNm permettait l'expression de ce dernier dans environ 35 % de cellules dendritiques ¹⁴⁹. La quantité d'ARNm transfectée souvent nettement supérieure à celle utilisée dans notre étude semble ainsi être un des points les plus impactant.

De plus, nous avons pu remarquer que pour un peptide donné, les résultats obtenus *in vitro* dans les DC et *in vivo* dans les embryons de poisson zèbre sont inversés : la fonctionnalité *in vitro* est inversement corrélée avec la fonctionnalité *in vivo*. Cependant, il est important de noter que l'injection directe dans les embryons de poisson zèbre ne s'interprète pas comme un test de transfection mais uniquement comme un test de fonctionnalité. En effet, l'ARNm nu ou complexé est apporté directement dans le cytoplasme des cellules, ce qui permet d'avoir des informations sur l'accessibilité des ARNm complexés par la machinerie de traduction. Pour confirmer l'effet inverse *in vitro* et *in vivo*, une analyse suite à l'injection en intramusculaire d'ARNm chez la larve avec les peptides RALA et LAH4 pourrait être intéressante. Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à cette inversion d'efficacité semble essentielle pour améliorer la prise en charge et l'expression des ARNm dans les deux modèles. Nous pouvons noter que des résultats similaires ont été obtenus avec des NP lipidiques. Les auteurs ont alors montré qu'une charge nette de surface neutre à pH physiologique semble optimale pour une délivrance *in vivo*, mais que l'absence de charge positive altère la prise en charge *in vitro* ³⁸⁸. Bien que les charges de surface soient légèrement moins positives pour les complexes formés avec les peptides RALA et LAH4, cette hypothèse ne semble pas expliquer seule les résultats obtenus. Les différences peuvent également être associées à des différences au niveau de l'environnement. Alors que *in vitro* les formulations sont dans un liquide contenant une population unique de cellules cibles, *in vivo*, elles se retrouvent dans un tissu et en présence de divers facteurs présents dans les liquides interstitiels pouvant recouvrir les vecteurs et modifier leur conformation ¹¹². *In vivo*, les particules peuvent être prises en charge par de nombreux types cellulaires, comme les DC myéloïdes, les DC plasmacytoïdes et les macrophages. Les DC plasmacytoïdes et les macrophages peuvent induire la différenciation des LT régulateurs qui peuvent altérer l'expression et l'induction de réponses immunitaires *in vivo* ⁹⁹.

Pour la suite du projet, de nouveaux peptides cationiques récemment identifiés ou décrits pour la vectorisation d'ADN, de siARN ou d'ARNm pourront également être testés.

2. Influence du format de délivrance des ARN messagers

Les ARN messagers libres ont une capacité de transfection limitée. En effet, ces molécules poly-anioniques traversent difficilement les membranes plasmiques elles-aussi chargées négativement. En accord avec ces données, nous avons pu voir tout au long de ce travail une absence de transfection des ARNm nus dans l'ensemble des types cellulaires testés. Bien que certaines études se soient intéressées à ce format de délivrance *in vitro* et *in vivo*¹²⁴⁻¹²⁷, la majorité des recherches se sont tournées vers l'utilisation de système de délivrance. De nombreux formats ont été développés, comme des polyplexes, des lipoplexes ou encore des nanoparticules lipidiques²³, et certains de ces vecteurs font notamment l'objet d'essais cliniques dans le domaine de la cancérologie et le développement de vaccins contre des maladies infectieuses. L'utilisation de système de délivrance permet notamment de protéger les ARNm et de prolonger leur durée de vie dans les milieu extra- et intracellulaires^{77,79}, de favoriser la prise en charge des ARNm par les cellules cibles pour permettre leur traduction en protéine antigénique tout en réduisant la quantité d'ARNm administrée¹²⁸. Cependant, les systèmes de délivrance présentent des compositions différentes, avec des morphologies, des tailles ou autres caractéristiques physicochimiques variées, qui peuvent influencer sur les réponses immunitaires induites.

Au cours de ce travail, nous avons évalué l'intérêt de polyplexes, formés de peptides et d'ARNm, et de nanocomplexes combinant les polyplexes aux NP de PLA élaborées au sein de l'équipe. Le peptide LAH4-L1 a notamment montré un intérêt particulier pour la prise en charge des formulations par les DC, l'expression de l'ARNm vectorisé et l'induction de réponses immunitaires. Cependant, nous avons pu remarquer une différence au niveau des réponses entre les polyplexes et le nanocomplexes. Avec un indice de polydispersité réduit, les nanocomplexes ont une taille monodisperse et un potentiel zêta de +37,3 mV. Les polyplexes présentent quant à eux un indice de polydispersité plus élevé témoignant de la présence d'agrégats, et un potentiel zêta moins élevé (+25,0 mV). Suite à la mise en contact de nos formulations avec les cellules, nous avons pu observer que les nanocomplexes ont conduit à une expression plus soutenue du transgène dans les cellules. En accord avec plusieurs études récentes, il semble que le format nanoparticulaire donne un réel avantage pour la transfection d'ARNm^{23,164}. Parmi les facteurs expliquant ces résultats, le regroupement de charges de surface semble jouer un rôle important pour favoriser leur prise en charge. L'ARNm est repoussé par les charges anioniques des glycoprotéines et phospholipides membranaires. L'utilisation de vecteurs cationiques permettrait ainsi une interaction avec la membrane, proportionnelle à la quantité de charges de surface positives. Ce faisant, les nanovecteurs pourraient forcer la membrane à s'incurver autour du vecteur et favoriser son internalisation par endocytose ou phagocytose : il s'agit

Discussion générale et perspectives

du phénomène de *wrapping* décrit et illustré par Nel *et al*¹¹². Ce modèle implique que la valeur de charge de surface, mais aussi la taille et la forme du matériel pourraient directement influencer l'interaction du matériel avec les membranes et ainsi la prise en charge des NP. Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi les nanocomplexes qui ont une charge de surface plus importante ainsi qu'une taille plus homogène que les polyplexes soient internalisés plus efficacement conduisant à une expression plus soutenue dans les cellules.

Cependant, bien que les charges positives de ces nanovecteurs favorisent leur internalisation, elles causent généralement une cytotoxicité qui freine l'utilisation de ces polymères cationiques *in vivo*. En effet, il a été proposé dans la littérature que le matériel cationique endocyté provoque une rétention des ions chlorure dans les endosomes et les endolysosomes¹¹². Afin de rétablir l'osmolarité, une entrée importante d'eau a lieu dans ces compartiments, conduisant à leur éclatement. Bien que favorable au relargage des ARNm dans le cytoplasme, ce phénomène s'accompagne de la libération du contenu des endosomes, et en particulier des enzymes lysosomales, qui sont délétères pour les cellules¹¹². En accord avec cette hypothèse de l'éponge à proton, la cytotoxicité des formulations semble proportionnelle à la charge de surface des complexes. En effet, à quantité égale, nous avons pu remarquer une cytotoxicité plus importante des nanocomplexes. Outre l'effet des charges, cette toxicité est certainement également due à la présence du LAH4-L1 dans les formulations. En effet, après analyse de la cytotoxicité dans des modèles de poisson zèbre, nous avons décelé une toxicité induite par ce peptide. Le LAH4-L1 est un peptide cationique amphipathique qui a une activité pénétrante dépendante du pH. A pH acide, la protonation des groupes imidazole des histidines va entraîner d'une part la libération des acides nucléiques vectorisés³⁸⁹ et d'autre part le relargage des endosomes^{339,365}, entraînant la formation de pores et une toxicité à forte dose. Il semble donc nécessaire de trouver une balance entre le mécanisme d'échappement des ARNm des endosomes, nécessaire à leur traduction, et l'induction d'une toxicité.

Afin d'améliorer la capacité de délivrance des ARNm et d'induire des réponses immunitaires adaptées, il est important de comprendre les mécanismes d'action de ces vecteurs. Les mécanismes d'endocytose des formulations ont été suivis suite au traitement des cellules avec différents inhibiteurs chimiques. L'évaluation de la prise en charge d'un ARNm marqué et l'expression d'un ARN codant une protéine fluorescente a été réalisée. Nos résultats suggèrent une prise en charge préférentielle des polyplexes et nanocomplexes par les voies d'endocytose clathrine-dépendante et par phagocytose. L'initiation de la réponse adaptative nécessite la reconnaissance par les LT-CD8+ et LT-CD4+ de courts peptides associés aux molécules de CHM-I ou -II respectivement à la surface des DC. Ces voies d'endocytose ont été décrites pour aboutir à une présentation des antigènes par les DC³⁹⁰. Cependant, nous nous attendions à obtenir des résultats différents avec les polyplexes et le

Discussion générale et perspectives

nanocomplexes. L'implication des deux voies suggèrent la présence d'agrégation des complexes. Les polyplexes présentant une plus grande hétérogénéité auraient pu être en partie internalisés par la voie clathrine dépendante, spécifique de la prise en charge des complexes de petites tailles¹¹⁴. Afin d'analyser la proportion de chaque voie impliquée dans la prise en charge, nous pourrions réaliser la même expérience mais en quantifiant par imagerie en flux.

Lorsque les polyplexes et nanocomplexes entrent en contact de fluides biologiques, comme le sang, le plasma ou les fluides interstitiels, ils vont se recouvrir de protéines (format une couronne de protéine) qui vont induire un changement de conformation des vecteurs avec des modifications au niveau des épitopes exposés à la surface des vecteurs^{112,391}. Cette modification peut ainsi changer la prise en charge des vecteurs par les cellules. De plus, la proximité avec ces protéines sériques, comprenant des enzymes comme les RNAses, peut engendrer une dégradation des ARNm³⁸². Par une analyse sur gel, nous avons montré une absence de protection des ARNm par les polyplexes et nanocomplexes en présence de sérum. En accord avec ceci, la transfection en présence de sérum n'a été efficace dans aucun des types cellulaires testés. Pour éviter les interactions non spécifiques l'ajout de poly(éthylène glycol) (PEG) peut constituer une alternative prometteuse. Le PEG permet, en effet, de réduire l'opsonisation par les protéines du sérum³⁹². Cette stratégie est d'ailleurs utilisée dans le cas des nanoparticules lipidiques²⁴. De plus, il est envisageable d'ajouter à la surface des complexes une bicouche lipidique protectrice. Cependant, la taille des vecteurs sera augmentée, conduisant certainement à une modification de leurs propriétés.

Pour conclure, nous avons montré au travers de cette étude que le format nanoparticulaire semble être favorable à l'induction d'une expression plus intense et soutenue des ARNm vectorisés. La plupart des études utilisent actuellement des NP lipidiques (LNP) pour la vectorisation des ARNm. Par rapport aux LNP, les NP-PLA présentent l'avantage de pouvoir co-délivrer les antigènes et des molécules immunostimulantes dans un même vecteur. Cette caractéristique permettrait d'orienter au mieux les réponses immunitaires et de les adapter à la pathologie ciblée. Par exemple, la réponse T_H1 peut être améliorée si l'antigène est encapsulé et/ou combiné avec un adjuvant spécifique³⁹³. Par exemple, l'ajout de CpG au système particulaire induit une réponse biaisée de type T_H1. En accord avec ces données, nous avons pu voir qu'en présence des NP-PLA, un adjuvant de type système de délivrance, la réponse T_H1 semble être légèrement favorisée par rapport au complexe LAH4-L1/ARNm seul. De plus, les systèmes de délivrance réduisent l'induction trop forte de réponses inflammatoires³⁹³. Nous avons d'ailleurs pu remarquer une diminution des cytokines et chikines pro-inflammatoires sécrétées en présence des NP-PLA dans les formulations.

3. Influence de l'antigène vaccinal dans l'induction de réponses immunitaires

Un des facteurs les plus importants dans le développement de vaccins concerne le type d'antigène (antigène protéique ou sous forme d'acide nucléique) et le choix du modèle antigène lui-même. En effet, ce paramètre va influencer sur le type de réponses immunitaires induites.

Alors que les vaccins protéiques ont tendance à stimuler la réponse humorale avec la production d'anticorps et l'activation d'une réponse de type T_H2 , les antigènes basés sur l'utilisation d'acides nucléiques (ADN, siARN ou ARNm) se sont révélés très prometteurs pour l'induction d'une réponse cytotoxique associée à une réponse de type T_H1 . Les premiers résultats obtenus chez l'Homme avec les vaccins ADN n'ont pas permis de donner les résultats escomptés et les risques liés à son intégration ont conduit à une diminution des essais liés à leur utilisation. Au contraire, les nombreux travaux réalisés dans le but d'améliorer la protection et la stabilité des ARNm ont abouti à une augmentation exponentielle du nombre d'études liées à leur utilisation dans les formulations vaccinales^{23,343}, et à la réalisation de nombreux essais cliniques (comme décrit dans la partie 2 de l'étude bibliographique).

L'utilisation d'ARNm dans les formulations vaccinales présente de nombreux avantages^{23,118,343}. Parmi les intérêts liés à l'utilisation de ces biomolécules, nous pouvons citer les avantages liés à sa production. Les ARNm sont synthétisés par transcription *in vitro* permettant d'outrepasser l'utilisation de modèles cellulaires pour l'amplification de l'antigène. Ce système de production, associé à la possibilité d'adapter facilement et rapidement la séquence, constitue un des avantages majeurs des vaccins à ARNm, notamment pour pallier aux épidémies et/ou pandémies.

Les ARNm vaccinaux ainsi produits vont coder pour une protéine unique qui va être traduite directement dans les cellules du patient. Cette production interne permet l'ajout de modifications post-traductionnelles fidèles à l'antigène en cas d'infection par le pathogène associé. Ces modifications post-traductionnelles propres aux mammifères, telles que le repliement, le clivage, l'association de sous-unité et l'ajout de motifs, sont essentielles au fonctionnement correct des protéines. Dans le cas de vaccins, ceci permet à l'antigène d'être reconnu au mieux par le système immunitaire et d'induire la réponse immunitaire la plus adaptée au pathogène ciblé. Cependant, il est important de prendre en compte ces potentielles modifications dans le design des vaccins car certaines modifications post-traductionnelles ont été modifiées et/ou supprimées volontairement dans les vaccins protéiques pour favoriser la reconnaissance par le système immunitaire.

Discussion générale et perspectives

Cependant, cette stratégie implique l'utilisation d'un ARNm codant pour une seule protéine. Le choix de l'antigène lui-même est donc primordial dans le design de vaccins à ARNm. Au cours de ce travail, nous avons utilisé l'antigène Gag. Cet antigène est l'un des plus utilisés dans le contexte du VIH-1, notamment dans les études s'intéressant à l'induction de réponse T qui est associée à un contrôle de la charge virale^{286,394}. L'ARNm modèle gag code pour la polyprotéine antigénique correspondante composée des protéines p24, p17 et p7 du VIH-1. Cette polyprotéine, intervenant dans l'infection par le virus, a la capacité de s'auto-assembler et de bourgeonner à la surface des membranes pour former des particules type VLP (*Virus-Like Particles*). Par cette capacité à produire à la fois des protéines intracellulaires et des VLP relarguées dans le milieu extracellulaire, cet ARNm peut permettre l'induction non seulement d'une réponse cellulaire (*via* les LT CD8+), mais également humorale (*via* les LT CD4+), avec production d'anticorps et de cellules mémoires. Dans le cadre du VIH, cette réponse à large spectre peut permettre d'induire une diminution de la charge virale des patients atteints par le virus tout en protégeant ces derniers sur le long terme. Suite à la transfection des formulations dans les moDC *in vitro*, nous avons mis en évidence une maturation de ces cellules avec la présentation des antigènes sur les molécules de CMH-I et II, et l'induction d'une réponse de type T_H1 majoritaire avec une faible réponse T_H2.

Afin d'analyser l'impact de la formation de VLP dans l'induction de réponses immunitaires à large spectre, nous avons produit un ARNm portant une mutation sur la glycine en position 2 du gène codant pour gag (donnée non montrées). Cette mutation induit l'absence de myristoylation de la glycine, une modification post-traductionnelle nécessaire à l'auto-assemblage de la polyprotéine en VLP³⁸⁴. La fonctionnalité de cet ARNm dans les cellules dendritiques par réalisation d'immunofluorescence et de western-blot a été réalisée (données non montrées). Dans la suite du projet, il sera intéressant de comparer les résultats obtenus avec l'ARN gag normal ou muté, au niveau *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, nous nous attendons à avoir production de la protéine gag au niveau intracellulaire à partir des deux ARNm, mais avec une absence de relargage de VLP dans le cas de l'ARNm muté. Le relargage des VLP dans le surnageant de culture pourra être mis en évidence par dosage ELISA ou par détection en Western blot suite à la concentration des VLP par ultracentrifugation. Après transfection dans les moDC, nous nous attendons à observer à une absence de la réponse de type T_H2 avec ARNm muté. Suite à des administrations *in vivo*, une réponse immunitaire humorale diminuée et une absence probable de réponse de type T_H2 sont attendues chez les souris ayant été immunisées avec l'ARNm gag muté.

Dans la suite du projet, nous pourrions également réaliser des tests similaires en utilisant un ARNm codant pour la protéine d'enveloppe trimérique BG505 SOSIP.664, qui mime au plus près les

épitopes des anticorps neutralisants à large spectre³¹⁰. Une comparaison des réponses induites par les deux antigènes pourrait être intéressante.

Enfin, comme noté dans l'introduction, la grande variabilité du virus du VIH-1 est souvent décrite comme la cause majeure des difficultés dans le développement d'un vaccin efficace. L'utilisation de combinaisons d'ARNm antigéniques issus de différentes souches et cibles du VIH-1 dans une même formulation vaccinale pourrait constituer une stratégie prometteuse pour échapper à ce défi.

4. Influence de la concentration d'ARNm administrée

Un autre facteur important dans la modulation des réponses immunitaires porte sur la quantité d'antigène délivré, que ce soit suite à de la délivrance *in vitro* et *in vivo*.

Dans ce projet, nous avons montré un effet des polyplexes et nanocomplexes suite à des transfections *in vitro* de volumes permettant l'administration de 20 ng d'ARNm pour 25 000 cellules. Cette quantité d'ARNm représente une des plus faibles doses utilisées dans les études actuelles de délivrance. Cette quantité a été choisie en fonction du nombre de nanoparticules maximum par cellule pouvant être administrée sans cytotoxicité (30 000 NP par cellules). Une quantité supérieure induit une nette toxicité due à un « étouffement » des cellules par les NP³⁷⁰. Bien que nous ayons obtenu des résultats prometteurs *in vitro*, cette faible concentration des ARNm représente un des inconvénients majeurs pour une application *in vivo*. En effet, pour l'administration chez les animaux, un volume maximal recommandé doit être respecté. Dans de nombreuses études, la quantité d'ARNm administré chez les souris est comprise entre 5 et 40 µg d'ARNm^{38,48,140,185}, avec une dose souvent proche des 10 µg. Pour injecter 5 µg à partir de nos formulations, il faudrait administrer 250 µL, un volume dépassant les volumes recommandés. De plus, nos formulations étant réalisées en eau, l'ajout de glucose ou de solution isotonique dans les formulations est nécessaire avant une administration. Cette dilution induit une diminution supplémentaire de la concentration d'ARNm, amplifiant l'inconvénient des polyplexes et nanocomplexes ainsi formés.

Pour contourner cet inconvénient, l'utilisation d'ARNm auto-répliquatif peut être avantageux pour l'administration *in vivo*. En effet, la capacité d'autoréplication de ces ARNm permet d'amplifier la quantité d'antigène par cellule³². Par exemple, le groupe de Hekele *et al.* a montré que l'injection de 0,1 à 1 µg d'ARNm auto-répliquatif codant un antigène du virus de la grippe chez des souris donne une réponse comparable à celle obtenue suite à l'injection de deux doses d'ARNm non répliquatif à 80 µg^{38,190}. Dans ce sens, la vectorisation d'ARNm auto-répliquatif par les polyplexes LAH4-L1/ARNm et les nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm pourrait être intéressante. En effet, avec un tel

ARNm, la quantité d'ARNm à administrer respecterait le volume injectable maximum, dans le cas d'administration *in vitro*. Des tests préliminaires ont été effectués avec un ARNm auto-répliatif VEE-GFP (données non montrées). La taille de l'ARNm n'affecte pas sa vectorisation par les polyplexes et nanocomplexes, et la fonctionnalité des ARNm est maintenue. Cependant, nous pouvons mentionner que au vu de la taille et de l'encombrement d'un tel ARNm, le chargement à la surface des NP-PLA est certainement modifié. La réalisation de prédiction bio-informatique, *in silico*, pourrait nous apporter d'avantages d'informations. L'ensemble des analyses effectuées dans la partie II des résultats pourraient donc être effectuées avec des ARNm eGFP et gag auto-répliatifs.

5. Influence de la structure des ARNm pour l'induction de réponses immunitaires

Au cours de ces trois années de thèse, beaucoup de travaux de recherches se sont intéressés aux modifications des séquences d'ARNm pour améliorer l'expression et la stabilité de ces biomolécules et/ou encore de diminuer ou augmenter leur reconnaissance par le système immunitaire. Dans notre étude, nous avons utilisé un ARNm gag comportant une queue poly-A de 64 nucléotides et une coiffe simple.

Au cours de ces travaux, nous avons pu remarquer que les formulations basées sur l'utilisation du peptide LAH4-L1 ont une capacité à activer seul les récepteurs de l'immunité innée TLR3, TLR7 (en proportion plus faible) et RIG-I, trois récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'ARN, par l'intermédiaire de structures secondaires plus ou moins longues (séquence de 40-50 et 20 paires de bases pour TLR3 et RIG-I respectivement)⁸⁶. Cette activation est amplifiée par la présence de l'ARNm dans les formulations, montrant la spécificité de l'effet adjuvant des ARNm eux même. Ces données sont en accord avec les données montrant la capacité des ARNm à être reconnus comme un signal de danger par la DC^{49,101}. Cependant, bien que l'induction de ces récepteurs conduise à une activation des DC nécessaire à leur maturation, elle aboutit également à l'induction d'une réponse inflammatoire. Alors que de faibles quantités d'interférons de type I, impliqués dans l'inflammation, peuvent améliorer les réponses immunitaires, une forte concentration va inhiber la machinerie traductionnelle de la cellule impactant directement le mécanisme des vaccins à ARNm¹⁵⁷. Pour obtenir un vaccin à ARNm efficace, il est important d'avoir une balance entre l'activité immunostimulante induite par les ARNm et leur expression dans le cytoplasme des cellules.

Des pistes sont à envisager afin de réduire l'activité immunostimulante des formulations. L'apport de modifications stabilisatrices, telles que l'ajout de nucléotides modifiés, est en cours d'investigation au laboratoire. De plus, nous avons remarqué que l'activation des réponses innées est

Discussion générale et perspectives

principalement médiée pas le récepteur RIG-I, reconnu par les ARN portant des extrémités 5'-triphosphate libre. Cette analyse suggère que l'ajout de la coiffe sur nos ARNm n'est pas systématique. Pour cela, un traitement des ARNm par une phosphatase (Antartic phosphatase), devra être réalisé après l'ajout de la coiffe, ce qui diminuera la reconnaissance par le récepteur RIG-I. De plus, l'utilisation d'une coiffe ARCA permettra d'augmenter l'expression.

L'induction d'une réponse inflammatoire n'a été observée qu'avec les formulations contenant le LAH4-L1 et est amplifiée par la présence de l'ARNm. Une meilleure purification des ARNm pourrait également permettre de diminuer l'induction d'une réponse inflammatoire trop forte qui peut être néfaste³⁶. Les étapes de synthèse des ARNm aboutissent à la production d'un transcrit d'intérêt dans une solution qui contient des transcrits abortifs ou des ARN double brins générés par des extensions auto-complémentaires, une transcription amorcée à partir d'une matrice d'ARN ou une activité ARN polymérase ARN-dépendante³⁶. La présence de ces contaminants peut affecter les réponses immunitaires induites. Dans cette étude, nous avons utilisé un ARNm gag purifié par précipitation au chlorure de lithium. Ce type de purification permet d'éliminer les nucléotides non incorporés de manière efficace, mais pas les transcrits abortif ou les ARN db au-delà d'une certaine taille. De plus, des traces de lithium peuvent persister pouvant altérer la physiologie de la cellule (le lithium étant par exemple un inhibiteur connu de la protéine GSK3 impliquée dans la transduction du signal Wnt). La purification HPLC se présente actuellement comme une technique de choix dans la purification des ARNm à visée vaccinale³⁶. En effet, ce procédé de purification est utilisé dans plusieurs groupes. Dans la suite de ce projet, une technique HPLC pourra être appliquée en prenant garde aux modifications de structures pouvant apparaître et conduisant à une modification des conditions de formulations.

Pour la suite de ce projet, et pour les prochaines études portant sur les vaccins à ARNm, l'achat d'ARNm modifiés et optimisés directement chez des fournisseurs est envisagé. Outre les facteurs coût et temps, cette stratégie peut permettre d'obtenir une meilleure reproductibilité entre les lots d'ARNm et les différentes études.

CONCLUSIONS GENERALES

Conclusions générales

La recherche en vaccinologie moderne fait appel à un ensemble de technologies nouvelles en immunologie, biochimie et biologie moléculaire pour développer de nouveaux vaccins et améliorer ceux déjà existants. Ce développement se fait dans le but de diminuer le nombre de doses nécessaires, d'administrer les vaccins par des voies adaptées à chaque pathologie ciblée, de diminuer les coûts de production mais aussi d'orienter le système immunitaire vers une réponse adaptée.

Les études effectuées durant ce travail de thèse ont permis de développer une nouvelle plateforme vaccinale permettant de véhiculer des ARNm sur les nanoparticules de PLA : les polyplexes LAH4-L1/ARNm et les nanocomplexes NP-PLA/LAH4-L1/ARNm. Cette étude constitue ainsi le premier rapport montrant l'intérêt de NP polymériques pour la vectorisation d'ARNm. L'utilisation de ces NP-PLA biodégradables dans les formulations vaccinales présente certains avantages, notamment liés à leur potentiel pour vectoriser à la fois des antigènes et des molécules immunostimulantes, à leur absence de cytotoxicité intrinsèque, et à leur stabilité.

Dans cette étude, les polyplexes et nanocomplexes ont été efficacement pris en charge par les cellules dendritiques (DC), des cellules orchestrant la liaison entre l'immunité innée et adaptative et essentielles pour le développement de réponses cytotoxiques, et ont permis l'expression soutenue de ces biomolécules dans leur cytoplasme. A faible dose, ces vecteurs ont d'ailleurs montré une efficacité supérieure à celle obtenue avec un agent commercial (Trans IT), avec une toxicité limitée. De plus, ces vecteurs ont montré une activité immunostimulante, spécifique des ARNm, nécessaire à l'activation des DC, et une capacité à médier les réponses adaptatives. Une maturation de DC primaires avec la présentation de peptides sur le CMH-I et le CMH-II, ainsi qu'une signature cytokinique associée à une réponse de type T_H1 ont été observées. Ce type de réponse est associé à l'activation de cellules cytotoxique permettant la lyse de cellules infectées, et est au centre du mécanisme de vaccination thérapeutique.

Il a été proposé que cette stratégie thérapeutique appliquée à la vaccination anti-VIH-1, pourrait constituer une alternative ou un complément aux traitements antirétroviraux afin d'aider le système immunitaire des patients à contrôler l'infection. Ces vecteurs pourraient notamment constituer un outil de choix dans le cas de thérapies basées sur l'activation des DC *ex vivo*. Bien que cette stratégie présente certains inconvénients liés à l'application à grande échelle, de nombreux essais cliniques l'utilisant ont montré des résultats prometteurs^{51,232}. Une des perspectives directes de ce projet va consister en l'évaluation de la capacité de DC issus de patients infectés activés par ces formulations à induire une stimulation de LT.

Cependant, nous pouvons émettre un point de vigilance quant à leur utilisation pour des administrations directes *in vivo*. Les premiers tests préliminaires montrent une sensibilité des

Conclusions générales

formulations au contact de sérum et une absence de fonctionnalité de ces dernières dans des modèles de poisson zèbre. Après l'apport de certains ajustements au niveau des formulations, une étude *in vivo* de l'intérêt des formulations sera réalisée. Ces expériences permettront de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et d'apporter des informations complémentaires quant à l'intérêt de l'ARNm modèle gag.

Pour conclure, ce travail a montré la possibilité de vectoriser les ARNm par les NP-PLA, un vecteur polymérique d'intérêt dans le domaine de la vaccinologie. Ces systèmes de délivrance ont montré des résultats prometteurs pour une application en thérapie *ex vivo*, notamment dans le cas de vaccins anti-VIH-1. Cependant, puisque les ARNm ne diffèrent entre eux que par leur séquence et gardent une même architecture, ils offrent une grande flexibilité pour la conception de nouveaux vaccins dirigés contre divers virus ou encore en oncologie. Ceci peut permettre la production rapide et à grande échelle de vaccins dans le cas de pandémie et également de couvrir de nombreuses pathologies.

ANNEXES

Production scientifique

Annexe I : Article 1

Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting.

Annexe II : Article 2

Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine Vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion.

Production scientifique

Publications :

Revue publiée en 2016 : (Annexe I)

Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. Gutjahr A *, Phelip C *, Coolen AL, Monge C, Boisgard AS, Paul S, Verrier B. *Vaccines*. 2016 4(4-34).

Article publié en 2017 : (Annexe II)

Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion. Rességuier J, Delaune E, Coolen AL, Levraud JP, Boudinot P, Le Guellec D, Verrier B *Front. Immunol.* 2017 8:190.

Article en cours de rédaction : (Partie Résultats - I-3)

Comparison of different Strategies to vectorize mRNA onto Poly(lactic acid) nanoparticles using cationic intermediates. Coolen AL*, Lacroix C*, Vachez L, Coiffier C, Mercier-Gouy P, Humert G, Delaune E, Exposito JY, Verrier B
En cours de rédaction

Article soumis en 2018 : (Partie Résultats - II)

Poly(lactic acid) Nanoparticles and Cell-Penetrating Peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in Dendritic cells triggering their activation. Coolen AL, Lacroix C, Mercier-Gouy P, Delaune E, Monge C, Exposito JY, Verrier B
Biomaterials. 2018

Communications orales :

Journée Scientifique ARCI

Vectorisation d'ARNm vaccinal codant l'antigène Gag du VIH à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly (acide lactique).

Octobre 2017, L'Isle d'Abeau, France

Journée Ecole doctorale EDISS

Vectorisation d'ARNm vaccinal codant l'antigène Gag du VIH à l'aide de nanoparticules biodégradables de poly (acide lactique).

Novembre 2017, Lyon, France

Posters :

Journée Scientifique ARCI

Vectorization of vaccinal mRNA encoding HIV antigen using biodegradable poly (lactic acid) nanoparticles. Coolen AL, Lacroix-Gimon C, Ung KL, Terrat C, Delaune E, Verrier B
Septembre 2016, L'Isle d'Abeau, France

Congrès IRCI - 1st International Symposium on Immune responses in Cancer and Infection :

Vectorization of vaccinal mRNA encoding HIV antigen using biodegradable poly (lactic acid) nanoparticles and dendritic cells uptake. Coolen AL, Lacroix-Gimon C, Ung KL, Terrat C, Delaune E, Verrier B
Février 2017, Lyon, France

Congrès HIV Vaccine – Keystone Symposia

Vectorization of vaccinal mRNA encoding HIV antigen using biodegradable poly (lactic acid) nanoparticles. Coolen AL, Lacroix-Gimon C, Monge C, Ung KL, Terrat T, Delaune E, Verrier B
Mars 2017, Steamboat Springs, Colorado, USA
Obtention d'une bourse étudiante

Congrès HIVR4P – The research for prevention

Vectorization of vaccinal mRNA encoding HIV antigen using biodegradable poly (lactic acid) nanoparticles targeting dendritic cells. Coolen AL, Lacroix-Gimon C, Mercier-Gouy P, Exposito JY, Terrat T, Delaune E, Verrier B
Octobre 2018, Madrid, Spain
Obtention d'une bourse étudiante

Review

Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting

Alice Gutjahr ^{1,2,3,†}, Capucine Phelip ^{1,†}, Anne-Line Coolen ¹, Claire Monge ¹, Anne-Sophie Boisgard ¹, Stéphane Paul ³ and Bernard Verrier ^{1,*}

¹ Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305, Université Lyon 1, CNRS, IBCP, Lyon 69007, France; alice.gutjahr@ibcp.fr (A.G.); capucine.phelip@ibcp.fr (C.P.); anne-line.coolen@ibcp.fr (A.-L.C.); clairemonge.biotech@gmail.com (C.M.); anne-sophie.boisgard@ibcp.fr (A.-S.B.)

² InvivoGen, Toulouse 31400, France

³ Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, INSERM CIC1408 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, Saint-Etienne 42270, France; stephane.paul@chu-st-etienne.fr

* Correspondence: bernard.verrier@ibcp.fr

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Olga Borges

Received: 23 August 2016; Accepted: 29 September 2016; Published: 12 October 2016

Abstract: Vaccines have successfully eradicated a large number of diseases. However, some infectious diseases (such as HIV, *Chlamydia trachomatis* or *Bacillus anthracis*) keep spreading since there is no vaccine to prevent them. One way to overcome this issue is the development of new adjuvant formulations which are able to induce the appropriate immune response without sacrificing safety. Lymph nodes are the site of lymphocyte priming by antigen-presenting cells and subsequent adaptive immune response, and are a promising target for vaccine formulations. In this review, we describe the properties of different polymer-based (e.g., poly lactic-co-glycolic acid, poly lactic acid . . .) particulate adjuvants as innovative systems, capable of co-delivering immunopotentiators and antigens. We point out how these nanoparticles enhance the delivery of antigens, and how their physicochemical properties modify their uptake by antigen-presenting cells and their migration into lymph nodes. We describe why polymeric nanoparticles increase the persistence into lymph nodes and promote a mature immune response. We also emphasize how nanodelivery directs the response to a specific antigen and allows the induction of a cytotoxic immune response, essential for the fight against intracellular pathogens or cancer. Finally, we highlight the interest of the association between polymer-based vaccines and immunopotentiators, which can potentiate the effect of the molecule by directing it to the appropriate compartment and reducing its toxicity.

Keywords: vaccine; adjuvant; immunogenicity; polymer; nanoparticles; nanodelivery; lymph node; antigen; molecular adjuvant

1. Why do We Need Adjuvants?

Preventive vaccination is one of the major successes of medicine. It represents one of the most cost-effective health investments and, according to the World Health Organization, saves 2 to 3 million lives every year. However, infectious diseases (such as HIV, *Chlamydia trachomatis*, *Bacillus anthracis* or malaria) remain a leading cause of death worldwide. In the early days of vaccination, heterologous pathogens (nonpathogenic relative of the organism, such as cowpox virus for smallpox vaccination) [1], or attenuated pathogens (with decreased pathogenicity thanks to repeated culturing, such as the tuberculosis vaccine) were used to immunize populations. Those vaccines have a high intrinsic immunogenicity and usually induce asymptomatic infections that generate a life-long immunity similar

to the one observed for individuals recovering from a natural infection. However, for many pathogens, this kind of vaccine has not been successfully developed, notably because of safety issues. Inactivated toxins (such as the inactivated tetanus toxin) or inactivated pathogens (such as the inactivated Polio virus), as well as synthetic peptides and recombinant protein subunits are now developed, but they have a poor immunogenicity. Therefore, they require a co-administration with adjuvants in order to elicit a robust immune response. Among various categories of adjuvants, delivery systems enhance antigen uptake by antigen-presenting cells and their migration into lymph nodes (LNs). Indeed, LNs house B and T lymphocytes, and are the site of lymphocyte priming by antigen-presenting cells for the induction of a subsequent adaptive immune response. Delivery systems can increase the persistence into the LNs and promote a mature immune response. There is a need for innovative adjuvants for prophylactic (preventive) vaccination, but also for therapeutic vaccines. Indeed, the use of vaccination to fight infections or cancer has been in the spotlight recently. The induction of a strong CD8⁺ T-cell immunity is central to elicit the destruction of infected or malignant cells [2], and the use of nanoparticulate vaccines seems to induce this kind of immune response through multiple pathways. For these reasons, adjuvantation is a promising strategy to address the challenges for the design of effective vaccines.

2. Biodegradable Nanoparticles for Vaccine Delivery

Biodegradable polymeric particles have been extensively studied during the past two decades. Biodegradable polymers are used in various medical applications, such as wound healing, tissue engineering, orthopedic devices, cardiovascular applications or vaccine administration. The use of nanoparticles (NPs) for vaccine administration was termed “nanovaccinology” in 2012 [3] and presents tremendous potential. Additionally, the use of biodegradable polymers for NP production is safe and reliable. They are indeed excellent adjuvants due to their physicochemical properties, which can be tuned to adapt to the desired antigen release profile and immunological response. Particle size can be tuned by changing the polymer concentration and the method of synthesis [4]. For these reasons, biodegradable NPs are ideal vectors for drug and protein delivery, and thus outstanding candidates for the future of vaccine administration [5–9].

2.1. Various Polymers for Vaccine Application

Biodegradable polymers are degraded *in vivo* by enzymatic processes, either hydrolysis or other mechanisms, and the degradation products are further eliminated by the normal metabolic pathways. This simple characteristic means that these materials have a great potential in medicine.

The field of bioengineering offers a wide range of biodegradable polymers to produce NPs. Multiple polymers are already approved by the U. S. Food and Drug Administration (FDA) for some applications, even though no NP formulation has been approved for vaccination so far [10]. Synthetic or natural biodegradable polymers may be used and each family has attractive properties. However, the most popular biodegradable polymers used in vaccine applications are poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly lactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL), three synthetic polymers.

PLGA is a highly compatible co-polymer of PLA and poly glycolic acid (PGA), and is FDA-approved for diverse applications. It has emerged as an attractive polymer as it offers wide possibilities for sustained drug delivery. For vaccine applications, NPs of PLGA can carry the antigen by encapsulation or surface attachment by covalent or ionic bonding [11].

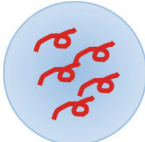
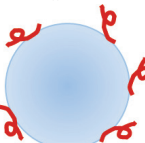
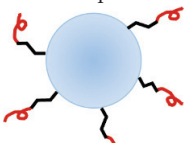
Together with PLGA, PLA is one of the most widely used polymers for particulate vaccine delivery, as a single polymer [12,13] or as a co-polymer when coupled to polyethylene glycol (PEG) [14] or PLGA [15]. This polymer is FDA-approved and its nanoformulation has already shown its efficacy in stimulating an efficient immune response after parenteral administration [16,17]. One of the major advantages of this anionic polymer is the possibility of encapsulation of hydrophobic molecules. It has been shown that PLA NPs can encapsulate or adsorb on their surface one or several antigens together with immunostimulant molecules like receptor ligands to improve their immunogenic potential [18].

Like PLA and PLGA, PCL is an aliphatic polyester and is of interest for its safety, low cost and compatibility with other polymers [19]. PCL has safe degradation by-products after hydrolysis of its ester linkages. Indeed, unlike PLA and PLGA, its degradation does not lead to the formation of lactic acid, which could affect the bioactivity of the antigen [20]. PCL has often been used for long-term implantable devices due to its slow degradation rate [6].

2.2. Polymers and Antigen/Immunopotentiator Association

The physicochemical properties of biodegradable polymers allow several ways to associate NPs and antigens, immunopotentiators or antigens/immunopotentiators together (Table 1). The bioactive molecules can indeed be trapped in the NPs by encapsulation and be released during NP degradation. The molecule of interest can also simply be adsorbed on the surface of the NPs by electrostatic or hydrophobic interactions [21]. This association is easy to perform but only provides a weak interaction with the NPs. This type of association could be interesting if the application requires a rapid release of the immunomodulators. A chemical conjugation provides a slight to strong association with the NPs by either adding a chemical cross-linker such as unmodified or modified polyethylene glycol (PEG), (interesting because of its thiol reactive maleimide), or by direct group association of the antigen with the carboxylic group of the NPs [22]. However, due to the aliphatic nature of these biopolymers, the strategies for conjugation are limited [23], which is why there is no reference to conjugation of an antigen with PCL nanoparticles in the literature. Yet, although no examples of the use of conjugated PCL nanoparticles for immunotherapy were found, conjugation by amide group could be possible. The ease of adsorbing single or multiple antigens or ligands in PLA/PLGA particles (compared with others adjuvants) explains the renewed interest in vaccine approaches using these polymeric nanoparticles [24].

Table 1. Possibilities to associate antigens or immunopotentiators to nanoparticles. Encapsulation is performed by mixing the bioactive molecule with the polymer during synthesis and leads to very few physical interactions with the nanoparticles (NP). Adsorption of the immunomodulators occurs via electrostatic or hydrophobic interactions and provides a weak association. A stronger association is provided by the chemical conjugation that links the immunomodulator and the NPs via a cross-linker.

Association	Type of Interaction	Polymers Involved
 Encapsulation	/	PLA, PLGA, PCL
 Adsorption	Electrostatic or hydrophobic	PLA, PLGA, PCL
 Conjugation	Chemical cross-linking	PLA, PLGA

3. Influence of Particle Characteristics on APCs Uptake and Targeting to Lymph Nodes

LNs are target organs for vaccine delivery, where B- and T-lymphocytes reside and are activated in the presence of an antigen. To access the LN, antigens can either enter directly or through intermediate

antigen-presenting cells (APCs). Two major types of APCs have been described for their ability to naturally uptake and process antigens: dendritic cells (DCs) and macrophages. They have similar functions, but only DCs are able to migrate from tissues to LNs and prime naïve T lymphocytes. In addition to their ability to migrate to the LNs, DCs have capacity to coordinate innate and adaptive immune responses *in vivo* and are involved in vaccination strategies [25]. Polymeric NPs enhance vaccine accumulation into LNs and promote superior cellular and humoral immunity to a variety of antigens in mice relative to soluble forms of protein and peptide vaccines [26]. Many studies have reported that nanoparticle characteristics such as size, shape or surface properties can significantly influence their biological activity [27,28]. For example, these parameters can affect targeting to specific cells, antigen uptake and the type of immune response induced. In this part, we discuss the influence of those NP properties on APC uptake and LN targeting.

3.1. Effect of Nanoparticle Size for APC Uptake and LN Targeting

Nanoparticles or exogenous pathogens can be taken up by cells through various pathways. Phagocytosis and pinocytosis (including clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis) are the two main endocytic pathways used for NP uptake (Figure 1). These different pathways differ in the composition of the coat, the size of the vesicles and the fate of the internalized molecule [29]. Macropinocytosis is a process for the endocytosis of extracellular material (0.5–5 μm) through membrane protrusions. Phagocytosis is involved in large size endocytic material with size ranges greater than 500 nm. Clathrin-mediated endocytosis induces the uptake of NPs with a size under 150 nm. Caveolae-mediated endocytosis allows different cellular processes including protein endocytosis. Generally, caveolae-vesicles induce the intracellular migration of materials with a size of 50–80 nm. NPs with a similar size as pathogens are efficiently recognized and taken up by APCs for the induction of the immune response [30]. NPs with a size between 20 and 200 nm are preferentially taken up by DCs, through the pinocytosis mechanism, while macrophages uptake larger NPs, from 0.5 to 5 μm , through macropinocytosis and phagocytosis [30].

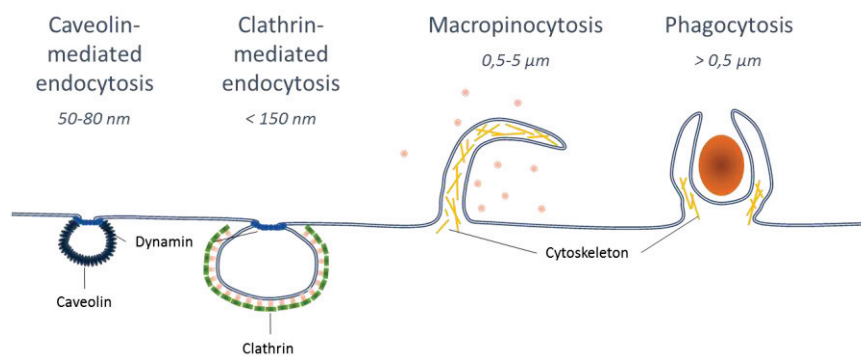


Figure 1. Pathways of endocytosis of exogenous particles, molecules or pathogens. According to the size of an extracellular molecule or particle, different endocytosis pathways take place to engulf it into the cell. Particles between 50 and 80 nm are taken into the cell through caveolin-mediated endocytosis, <150 nm by clathrin-mediated endocytosis, 0.5 to 5 μm through macropinocytosis and larger than 0.5 μm through phagocytosis.

Although intranodal injections can be performed, they are unusable for prophylactic vaccination, when the vaccine has to be administrated to a large number of persons in a rapid and convenient manner. Thus, alternative ways to direct vaccines to LNs have been developed. NPs can accumulate into LNs directly through lymphatic drainage or be taken up by APCs that will transport them to the LNs. Particle size is one of the most critical factors influencing NP uptake by immune target cells and drainage to the LNs for the induction of an optimal response. Some studies have reported that NPs with a size range between 0.5 and 2 μm are associated with an uptake by DCs at the injection site.

Smaller NPs (20–200 nm) are found in LN-resident APCs, suggesting free drainage to the LNs [31]. Another study established that particles larger than 100 nm have difficulty moving into lymphatic vessels and directly transit to LNs [32]. The size limit for lymphatic targeting is not clear and depends on both the tissue site and administration route. However, NPs with a size under 100 nm seem to be an efficient antigen delivery system to target LN-resident DCs and induce adaptive immunity [26].

Particle size can also affect the uptake efficiency and the immune response induction by APCs. Previous studies have established the preferential size of PLGA-based vaccines to induce an effective immune response (Table 2). Smaller PLGA NPs (300 nm) generate a better DC maturation and more efficient Ag-specific immune responses (IgG2a and CD8⁺ T lymphocyte) than 17 µm, 7 µm, 1 µm NPs in vivo in mice [5]. Three hundred and fifty nm PLGA NPs showed an improved internalization over 112 µm microparticles (MPs), correlated with a sustained cellular immune response in a mouse model [33]. Optimal size for efficient uptake and immune induction has not yet been clearly defined. However, nanoparticles seem to be able to trigger either humoral or cytotoxic immune responses depending on their size, probably due to the endocytosis pathway implicated [34,35].

3.2. Influence of Particle Shape for Cellular Uptake

Naturally, APCs can internalize various pathogens which can be distinguished by multiple shapes, such as rods, spirals, and ellipsoids. Polymeric delivery systems currently investigated have a spherical shape. However, in recent years, novel methods have allowed the manufacture of polymeric NPs with various shapes [36], and the influence of shape on cellular uptake and biodistribution has been investigated [27,36,37]. Non-spherical NPs show an improved membrane attachment, but a reduced uptake by APCs [17,37]. The non-spherical particle orientation is advantageous for phagocytosis initiation [37], but the membrane wrapping which in theory requires more actin remodeling may explain the more difficult and slower internalization of these particles [17]. Moreover, the shape has an influence on organism biodistribution [38]. This factor is important for the design of NPs for drug delivery at specific sites [39]. This parameter has to be taken into account for cellular uptake and subsequent draining to LNs.

3.3. Influence of Surface Characteristics of Polymeric NPs.

Surface properties such as charge and hydrophobicity have been reported to influence the uptake of NPs. Surface charge of NPs plays a significant role in the endocytosis mechanism and the activation of immune responses. Because cell membranes are negatively charged, cationic particles can be more efficiently taken up by APCs than anionic particles. For example, positively charged chitosan-based NPs have an increased internalization rate in eight types of cells, compared to neutral and negatively charged NPs [28]. In all cases, the surface charge of polymeric NPs (cationic or anionic) can be modified by using molecules with various charges like PEG or protamine [40,41]. Although cationic NPs are advantageous to enter into the cells, negative polymeric PLA NPs are also efficiently internalized by DCs [16]. Because positive NPs are more efficiently taken up by APCs, they can migrate through sentinel DCs to LNs, whereas negatively-charged polymeric particles, with a lower cellular uptake rate, might reside at the injection site and can permit antigen or immunopotentiator delivery at the site of injection [28]. Hydrophobicity has also been reported to affect NP uptake and immune response induction. In fact, hydrophobic particles induce a higher immune response than hydrophilic NPs through their increased susceptibility for phagocytosis [7].

In summary, NP size, shape and surface characteristics have an impact on their distribution in the organism, the endocytic processes involved and on the induction of immunity. As modifications in NP properties can induce different responses, the consideration of these parameters is central for adjuvants to target APCs and LNs.

4. Immune Responses and Functionalized Nanoparticles

The induction of a protective immunity requires antigen uptake either by circulating APCs present at the vaccine administration site or by LN-resident APCs after antigen migration through lymphatic vessels (Figure 2).

The APC uptake of soluble antigens is often insufficient to induce a protective immunity [42]. As antigen delivery systems, particles have demonstrated a huge potential for the development of vaccines and immunotherapies. The delivery of antigens loaded on NPs has several advantages: it prolongs antigen presence, enhances DC-mediated antigen uptake, directs stimulation of DCs and promotes immune responses [35]. Studies have investigated the advantages of polymeric NPs to induce an immune response in comparison with soluble antigens. For example, the loading of DCs with OVA formulated with PLGA-NPs has been shown to induce a more efficient duplication of CD4⁺ T-cells than soluble OVA (even at 500-times higher dose) [42].

After vaccine administration, antigens coupled to NPs are taken up by APCs (and notably by DCs) directly at the injection site or migrate to LNs through lymphatic vessels to target resident DCs (Figure 2). Via endocytosis, APCs process the foreign materials, induce the presentation of the antigenic fragment on their surface through Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules, and activate T-cells responses [43]. Depending on the endocytosis pathways, influenced by NP properties, and on the type of antigen loaded at the surface or into NPs, two types of immune response pathways can be potentially activated (MHC-I or MHC-II).

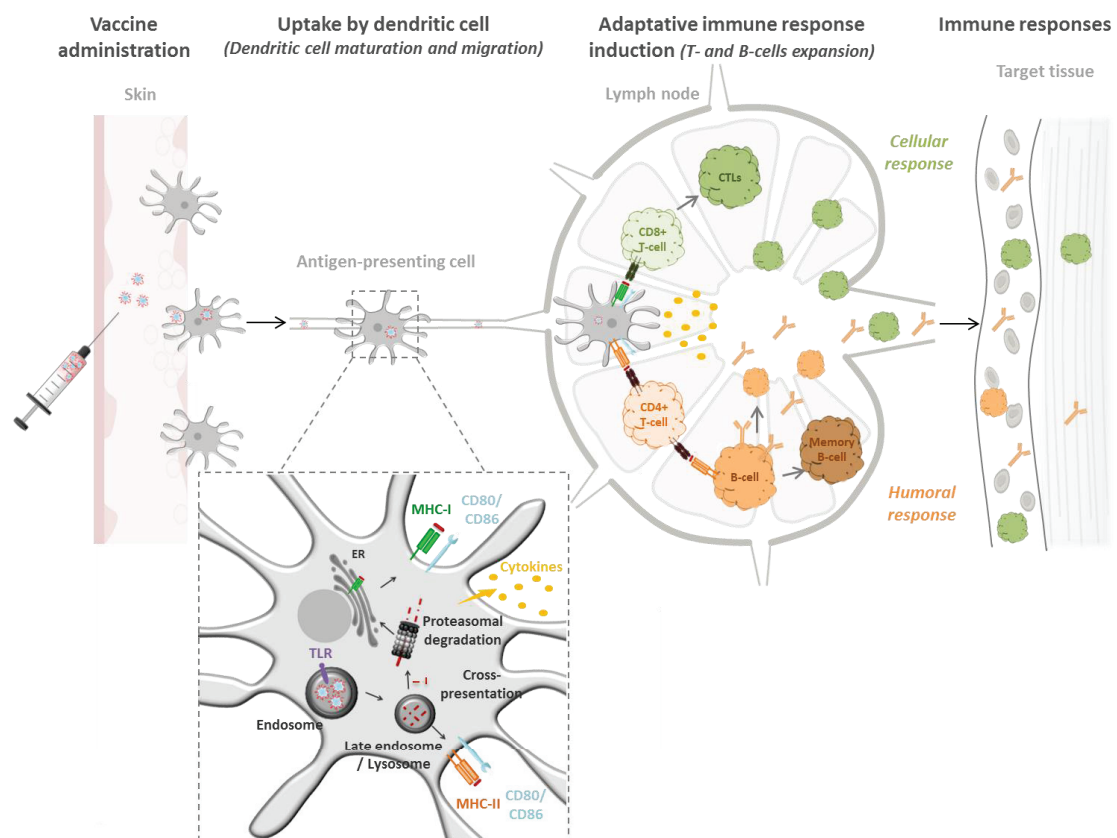


Figure 2. From vaccine administration to immune response. Administered NPs are firstly uptaken by APCs and the antigen is processed to be presented by the appropriate MHC. Antigenic peptide presented through MHC-I induce cytotoxic immune response, the peptides presented through MHC-II can activate CD4⁺ T cells that can provide help for the humoral immune response.

Studies confirm the added value of NPs as antigen delivery systems to induce broad and potent immune responses. Using an *ex vivo* priming assay, Petrizzo et al. [42] have demonstrated the efficacy of antigen delivery by PLGA NPs to induce the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into memory cells with a TH1 phenotype. Moreover, several antigens can be loaded in the same polymeric NPs. This property allows the induction of a broad immune response. For example, the co-adsorption of HIV p24 antigen and gp120 envelope glycoprotein onto PLA NPs conserves the antigenicity of the proteins and the co-formulation elicits higher antibody titers compared to the gold standard MF59 [44].

Another important goal when designing antigen delivery systems in vaccination is the possibility of obtaining cross-presentation. The cross-presentation process consists of the presentation of an exogenous antigen, normally presented by the MHC-II pathways, in the context of MHC-I [45,46]. Antigens released by NPs in endosomes escape to the cytoplasm, are degraded in molecular fraction by the proteasome and loaded to the MHC-I. The MHC-I/peptide presentation at the APC surface, the expression of CD80/CD86 and the cytokine release induce the differentiation of CD8⁺ or cytotoxic T-cells [43]. Cross-presentation allows antigen presentation through both routes, and the use of particulate vaccines is one way to facilitate endosomal disruption after internalization [47]. The interest of poly(propylene sulfide) NPs was demonstrated, showing a targeting of LN-resident DCs and the induction of cross-presentation by NPs, leading to a cytotoxic immune response [48]. The delivery of antigens with NPs leads to their presentation through specific intracellular pathways, allowing the control of the type of immune cell stimulated by the APCs and the subsequent immune response [49].

5. Nanodelivery of Immunopotentiators

5.1. Immunopotentiators as Powerful Vaccine Adjuvants

Two classes of adjuvants are found in most modern vaccines: carrier systems and immunostimulant molecules [50]. As presented earlier, carrier (or delivery) systems, such as polymeric NPs, present the vaccine antigens in an optimal way to the immune system. Immunostimulatory molecules, in contrast to carrier systems, act directly on the immune system to potentiate or orient the immune response against the target antigen.

It is known that the immune system receptors called pathogen-recognition receptors (PRRs) are targeted by conserved microbial products called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Bacterial cell wall components, viral RNA and CpG DNA are natural pathogen components which activate PRRs. As they are present in most of the whole pathogen-based vaccines, the stimulation of PRRs has been unwittingly used in vaccines for years. Since the early days of the study of innate immunity [51], the interactions between PAMPs and PRRs have been extensively analyzed. Toll like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors, RIG-I-like receptors (RLRs) and C-type lectin receptors (CLRs) are the four main groups of PRRs. They sense the presence of infection and activate innate immunity but also have direct effects on the activation of adaptive immunity. Most of the molecular adjuvants currently under evaluation are PRR ligands [52]. The receptors currently targeted by polymeric nanoformulations are mostly endosomal receptors TLR3 [53], TLR4 [54], TLR7/8 [55] and TLR9 [56] (Table 2). TLR3 is stimulated by double-stranded RNA, TLR4 by lipopolysaccharide (LPS), TLR7 and TLR8 by single-stranded RNA and TLR9 by DNA containing CpG motifs (CpG oligodeoxynucleotides, ODN).

Combinations of delivery systems and immunostimulant molecules are commonly being developed as adjuvants because they have the potential to act synergistically to enhance the antigen-specific immune response. Nanodelivery can enhance the immunostimulatory properties of formulated molecules through multiple mechanisms: it can enhance the activity of the adjuvant through its concentration within lymphoid organs, prolonging its exposure to immune cells, it can allow the targeting of the appropriate cellular compartment or change the biological effect of those molecules and protect it from degradation. Moreover, these systems allow the co-delivery of immunopotentiators and antigens, which seems to be valuable for vaccine efficacy as reviewed later.

5.2. Improving Nanovectors Efficacy with Molecular Adjuvants

Biodegradable polymer-based nanovectors are often poorly immunogenic and the co-administration with molecular adjuvants is of great interest to improve and/or orient the immune response. For prophylactic vaccination, the co-encapsulation of soluble *Leishmania* antigens with the TLR4 ligand MPLA (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A), the only TLR ligand approved as an adjuvant in human licensed vaccines preventing human papillomavirus, hepatitis B and malaria infection [57], proved to be an interesting tool for vaccination. The encapsulation of MPLA in 300 nm PLGA nanoparticles enhances the stimulation of DC maturation compared with the formulation alone [58]. The encapsulation of NOD ligands into PLA NPs of approximately 200 nm potentiates their activity. In fact, nanoformulations are more efficient to induce DC maturation *in vitro* and the co-injection of encapsulated NOD ligands with PLA particles carrying Gag p24 HIV-1 antigen increases antibody response compared to the NPs without molecular adjuvant or co-administered with the free immunomodulator [18]. Similarly, Wischke et al. [59] demonstrated that the encapsulation of NOD agonists into PLGA MPs of approximately 5 μm allows human moDC maturation *in vitro*, unlike empty MPs or soluble NOD ligand.

Molecular adjuvants have also a great interest for therapeutic vaccination. The association of a poorly immunogenic melanoma antigen with TLR4 agonist in 400 nm PLGA nanoparticles has a potent anti-tumor effect in mice, activating antigen-specific CD8⁺ T cells able to secrete IFN- γ in LNs and the spleen [60]. TLR9 recognizes specific unmethylated CpG motifs present at a high frequency in the bacterial genome but absent from mammalian genomes. The use of PLGA microspheres (1–10 μm) carrying tumor lysates and TLR9 ligand CpG ODN is promising as an anti-tumor vaccine against prostate carcinoma. Indeed, the co-encapsulation of tumor lysates with CpG-ODN induces high cytotoxic responses, leading to a reduction in tumor growth in a mouse model of prostate carcinoma [61]. Biodegradable polymeric NPs are a good alternative to adjuvants based on mineral oils that can be accompanied with adverse effects. In fact, the encapsulation of poly I:C within polyester (poly(D,L lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid) nanoparticles of approximately 450 nm with an antigen from HPV-induced malignancies enhances the population of antigen-specific CD8⁺ cells compared to the formulation without poly I:C, with a strong therapeutic effect and no adverse effects [62].

The uptake of the NPs and the entrapped molecular adjuvants can be further enhanced by surface-modifications. Targeting specific DC subsets by functionalizing vaccines with a DC-binding ligand is an innovative approach to enhance LN targeting and vaccine efficacy. The coating of 200 nm PLGA NPs encapsulating TLRs agonists with antibodies recognizing DC-specific receptors enhances the maturation of DCs and the secretion of pro-inflammatory cytokines, as well as the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vitro*, compared to the untargeted formulations. *In vivo*, a comparable induction of an antigen-specific cytotoxic response is observed with 100-fold lower amounts of adjuvant when the TLR3 and TLR7 agonists are co-encapsulated compared to their administration in soluble form [57]. The surface-modification of 300 nm PLGA nanoparticles with a TNF α mimicking peptide enhances the uptake of the nanoparticles by DCs *in vitro* [52]. Adjuvants that target DEC-205 or other cell surface molecules expressed by DCs using antibodies coupled to NPs have been shown to enhance accumulation within LNs and immunogenicity in mice [63] and to promote both cellular and humoral immunity in humans [64]. PLGA NPs (200 nm) loaded with TLR3 and TLR7 ligands and decorated with different monoclonal antibodies targeting DEC-205, CD40 or CD11c receptors (expressed on the surface of DCs) were compared. *In vitro*, the T-cell proliferation of both CD8⁺ and CD4⁺ cells was efficiently induced by DCs loaded with targeted NPs but not by the untargeted ones. Furthermore, vaccination with PLGA NPs targeted to CD40, DEC-205 or CD11c induced efficient *in vivo* CD8⁺ response, around 80% specific killing, compared to the 40% induced by non-targeted PLGA NPs [65].

The design of adjuvants mimicking pathogens is a good way to induce an immune response. Triggering a combination of TLRs in APCs can have synergistic effects. The simultaneous delivery of MPLA, CpG ODN and the model antigen OVA loaded on 200 nm PLGA particles induces

a strong immune response against the model antigen in a mouse model [66]. The localization of the immunopotentiator seems to be a crucial point for vaccine adjuvant design. The stimulation of humoral and antigen-specific T cell responses is enhanced when CpG is encapsulated, compared to its adsorption at the surface of the nanoparticulate vector, showing the interest of mimicking the biology of the pathogens. The stimulation of TLR4 and TLR9 has a synergistic effect when co-delivered in the same particle, especially for cytotoxic response after vaccination in a mouse model [66]. A synergistic increase in the antigen-specific humoral response is observed after the immunization of mice with 300 nm PLGA NPs containing the TLR4 ligand MPL and the TLR7 ligand R837 compared with the molecular adjuvants alone [67].

All these results show that the encapsulation of molecular adjuvants is an effective way to enhance nanoparticulate vaccine immunogenicity.

5.3. Delivery of the Immunostimulant Molecules and Antigens to a Target Compartment

The nanodelivery of molecular adjuvants has diverse effects: it can avoid its systemic dissemination, enhance its uptake by APCs and help its transport to the LNs where the DCs can present the antigen to T cells and direct the immune response. The nanoformulation of a TLR9 ligand (CpG ODN) to 30 nm ultrasmall pluronic-stabilized poly(propylene sulfide) (PPS) NPs allows the drainage of the formulation within LNs and the efficient uptake and cross-presentation by DCs in a mouse model. This efficient response induces a strong cytotoxic immune response [68]. In a recent study, Lynn et al. [69] showed that the covalent binding of a TLR7 ligand to a polymer forming NPs in high density induces a high-magnitude and persistent innate immune activation restricted to the LNs, a necessary condition for promoting protective T_H1 $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses, and high antibody titers. The nanoformulation of TLR7 ligands in PLA-PLGA NPs increases cellularity within the draining LNs when the formulation is injected while no cell infiltration is observed when the free ligand is co-administered with the NPs [70]. This property is not limited to polymeric NPs as it has been demonstrated that lipid NPs enhance LN accumulation of stimulator of IFN genes (STING) ligands [71].

Some PRRs, such as TLR3, TLR7 and TLR9 are expressed within the endosomal compartment. The delivery in endosomes of ligands targeting these receptors is possible when using nanoformulations (Figure 2). The entrapment of TLR7 and TLR9 agonists and a model antigen (OVA) within PLGA microsphere (1–30 μm) leads to phagocytosis by APCs and the transfer into endosomal compartments in vitro. The formulations induce strong Ag-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ -mediated immune responses in mice after parenteral administration, leading to protective and therapeutic effects [72]. The encapsulation of CpG ODN within poly(γ - glutamic acid)-graf t-L-phenylalanine ethyl ester (γ -PGA-Phe) nanoparticles is a good way to potentiate the effect of CpG ODN. It induces the uptake by macrophages and the internalization of CpG ODN into endo/lysosomes, where TLR9 is expressed. Interestingly, γ -PGA-Phe particles stimulate TLR4, and the co-delivery with a TLR9 ligand synergistically stimulates macrophages in vitro. The formulation induces higher OVA-specific cytotoxic immune response than the co-administration with free CpG ODN in mice [73]. As presented earlier, the size of the particles influences their uptake by DCs. The uptake is essential as it leads to the targeting of TLR by the appropriate agonist into DCs, which induces their maturation. PLGA NPs (350 nm) and MPs (112 μm) carrying a TLR3 ligand (poly I:C) and the model antigen OVA show an improved internalization of NPs over MPs, correlated with a sustained cellular immune response in a mouse model [34].

The delivery of PRR agonists to the right cells (i.e., LN-resident DCs) and to the right compartment (endosomal compartment of the cell, where the appropriate receptor is expressed) is a crucial point for vaccine adjuvant design. The encapsulation of these ligands within particulate vectors is one way to reach this objective.

5.4. The Nanodelivery of Immunomodulators Decreases Their Toxicity

Another interesting aspect of using nanoparticulate vectors is the reduction of the amount of immune modulators that can be toxic in high doses, and the reduction of their systemic dissemination after injection. Indeed, soluble molecular adjuvants can induce toxicity due to the rapid clearance to the bloodstream after injection and the induction of a cytokine storm. Their formulation within particles allows local immune responses within the LNs. Synthetic vaccine particles co-encapsulating a model antigen and TLR7/8 or TLR9 ligands co-delivered with the model antigen OVA induce stronger humoral and cellular immune responses with lower systemic production of pro-inflammatory cytokines than the co-injection with a free agonist [70]. The formulation of polymeric NPs with a TLR9 agonist leads to similar effects of the adjuvant with lower doses, thus limiting toxicity in a mouse model [68]. The binding of a TLR7 ligand with polymer particles has recently been studied, the nanoparticulate formulation leading to a reduced systemic innate immunity activation (often associated with adjuvant toxicity and morbidity) and improved vaccine immunogenicity [69]. The encapsulation of TLR3 and TLR7 agonists reduces their side effects and the related toxicity associated with their soluble administration in a mouse model [63].

5.5. Co-Delivery or Co-Administration with Antigens?

Different strategies propose to co-deliver within the same particle or to co-administer with two different carriers the antigen and the immune modulator. The co-delivery of a TLR7 agonist with a diphtheria-tetanus-pertussis DTaP antigen results in higher antibody titers when the TLR7 ligand is encapsulated inside PLGA nanoparticles of approximately 350 nm rather than co-administered in a mouse model. The simultaneous delivery of the antigens and the molecular adjuvant is advantageous for the induction of a strong immune response in this model [74]. The co-localization of CpG and antigen on PLGA NPs of around 250 nm in diameter induces much higher antibody titers than the co-administration with free CpG motifs in a mouse model. Moreover, it induces a superior protection to West Nile Encephalitis than the control adjuvant alum [75]. The co-delivery of a TLR9 agonist with a model antigen allows a better CD8⁺ immune response than the nanoparticle-conjugated antigen co-administered with the free ligand [68]. The co-delivery of a model antigen OVA and MPLA in 350–450 nm PLGA NPs induces their uptake by DCs, leading to the induction of CD4⁺ and CD8⁺ immune responses in vitro. In mice, this formulation offers clonal expansion of CD4⁺ T cells capable of cytokine secretion [76]. In vivo, the administration of poly I:C or CpG ODN encapsulated with OVA in 1 µm PLGA particles improves the CTL activity of NP-OVA. In a solid tumor model, the functionalized NPs exert potent antitumor activity [77]. The co-entrapment of poly I:C and CpG with OVA in 150 nm mannose-functionalized aliphatic polyester-based nanoparticles induces a long lasting T_H1 immune response that is not observed with the co-administered free molecules [78]. Interestingly, the release of PRRs agonists and antigens is important for the induction of an appropriate immune response. The comparison of bare, chitosan-coated and protamine-coated PLGA MPs for the coupling with antigen and CpG showed that uncoated MPs are more efficient for the induction of CTL response in mice. The authors assessed that the low release of the antigen and CpG with other formulations was the cause of this impaired activity [79]. To conclude, the co-delivery of immunopotentiator and antigens seems to be a powerful tool to induce a strong immune response.

Table 2. In vivo effects of the nanoformulation of molecular adjuvants.

Particles Characteristics (Polymer-Size)	Model (Antigen-Model)	Target Receptor	Co-Administration or Co-Delivery	Immune Response	Ref.
γ -PGA-Phe-200 nm	OVA-mouse	TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD8 ⁺ T cells response	[73]
HPMA-NIPAM-1 μ m	OVA-mouse	TLR7	Co-administration	CD4 ⁺ T cells response -Antibody	[69]
Mannose-functionalized aliphatic polyester-150 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[78]
PLA-200 nm	HIV-1 p24-mouse	NOD1 or NOD2	Co-administration	-Antibody -CD8 ⁺ T cells response	[18]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR7	Co-delivery	-CD4 ⁺ T cells response -Antibody	[65]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR4 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[66]
PLGA-200 nm	OVA-mouse	TLR3 + TLR7	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antibody	[63]
PLGA-250 nm	rWNVE-mouse	TLR9	Co-delivery	-Protection to West Nile Encephalitis	[75]
PLGA-300 nm	OVA-mouse	TLR4 + TLR7	Co-delivery	-Antibody	[67]
PLGA-350 nm	OVA-mouse	TLR3	Co-administration	-CD8 ⁺ T cells response	[33]
PLGA-350 nm	DTaP-mouse	TLR7	Co-delivery	-Antibody	[74]
PLGA-400 nm	OVA-mouse	TLR4	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD4 ⁺ T cells response	[76]
PLGA-400 nm	Melanoma antigen-mouse	TLR4	Co-delivery	-Anti-tumor effect -CD8 ⁺ T cells response	[60]
PLGA-1 μ m	OVA-mouse	TLR3 or TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antitumor activity	[77]
PLGA-1–10 μ m	Tumor lysate-mouse	TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -Antitumor activity	[61]
PLGA-1–30 μ m	OVA-mouse	TLR7 + TLR9	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response -CD4 ⁺ T cells response	[72]
pLHMGA-450 nm	HPV synthetic long peptide-mouse	TLR3	Co-delivery	-CD8 ⁺ T cells response	[62]
PPS-30 nm	OVA-mouse	TLR9	Co-delivery	-Cross-presentation -CD8 ⁺ T cells response	[68]

Abbreviations: DTaP, diphtheria-tetanus-pertussis; γ -PGA-Phe, poly(γ -glutamic acid)-graf t-L-phenylalanine ethyl ester; HPMA, *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide; NIPAM, *N*-isopropylacrylamide; pLHMGA, Poly(D,L-lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid); rWNVE, recombinant WN virus envelope protein.

6. Conclusions and Future Perspectives

Polymer-based particulate systems are effective delivery systems, able to deliver immunopotentiators and antigens. They enhance vaccine accumulation into LNs and promote superior humoral immunity to a variety of antigens relative to soluble forms. The nanoformulation allows the process of cross-presentation, leading to the induction of cytotoxic immune response, essential for the fight against intracellular pathogens and cancer. The nanodelivery of immune adjuvants has a great potential for vaccine adjuvantation. It allows the enhancement of the activity of the molecular adjuvant by concentrating it within the LNs, prolonging its exposure to immune cells, while reducing its toxicity. Thus, the co-delivery of antigens and immunopotentiators in polymeric nanoparticles seems to be an efficient way to induce a potent immune response.

A multitude of new challenges for the design of more effective vaccine adjuvants awaits the scientific community, with the manipulation of size, shape and other properties. Local toxicity of polymer-based particulate vaccines could be a detrimental issue, hampering their clinical use, this is why efforts have to be made to overcome this issue. Moreover, the development of delivery systems carrying RNA or DNA has been in the spotlight recently, and the development of polymer-based NPs carrying those molecules would allow their use for RNA and DNA vaccines. Indeed, even if mRNAs present multiple advantages for vaccine formulation, mRNA-based vaccines raise several challenges: protection, stabilization and transport of mRNAs to DCs to induce antigen production. In order to overcome these challenges, the development of polymeric NPs seems to be promising.

Acknowledgments: A.G. is supported by an ANRT doctoral fellowship in collaboration with InvivoGen. C.P. is supported by an ANRS doctoral fellowship, whereas A.L.C. is supported by a doctoral fellowship from ARC Santé Region Rhone-Alpes and A.S.B. by a CNRS doctoral fellowship. S.P. and B.V. are supported by grants from the

Fondation Pierre Bergé - Sidaction, two FP7 European grants CUT'HIVAC (No. 241904) and ADITEC (No. 280873) and HIVERA support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Moss, B. Smallpox vaccines: Targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *239*, 8–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dubensky, T.W.J.; Reed, S.G. Seminars in Immunology Adjuvants for cancer vaccines. *Semin. Immunol.* **2010**, *22*, 155–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mamo, T.; Poland, G.A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine* **2012**, *30*, 6609–6611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Astete, C.E.; Sabliov, C.M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Joshi, V.B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: Size matters. *AAPS J.* **2013**, *15*, 85–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mahapatro, A.; Singh, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnol.* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhao, L.; Seth, A.; Wibowo, N.; Zhao, C.X.; Mitter, N.; Yu, C.; Middelberg, A.P.J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* **2014**, *32*, 327–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Boraschi, D.; Italiani, P. From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines* **2015**, *3*, 930–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bolhassani, A.; Javanad, S.; Saleh, T.; Hashemi, M.; Aghasadeghi, M.R.; Sadat, S.M. Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10*, 321–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **2016**, *55*, 10–29. [[CrossRef](#)]
11. Moon, J.J.; Suh, H.; Polhemus, M.E.; Ockenhouse, C.F.; Yadava, A.; Irvine, D.J. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. *PLoS ONE* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Westwood, A.; Elvin, S.J.; Healey, G.D.; Williamson, E.D.; Eyles, J.E. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* **2006**, *24*, 1736–1743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kanchan, V.; Panda, A.K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5344–5357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dixit, S.; Singh, S.R.; Yilma, A.N.; Agee, R.D.; Taha, M.; Dennis, V.A. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles provide sustained delivery of a Chlamydia trachomatis recombinant MOMP peptide and potentiate systemic adaptive immune responses in mice. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1311–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fredriksen, B.N.; Grip, J. PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vaccine* **2012**, *30*, 656–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Primard, C.; Rochereau, N.; Luciani, E.; Genin, C.; Delair, T.; Paul, S.; Verrier, B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6060–6068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sharma, G.; Valenta, D.T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J.W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 408–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pavot, V.; Rochereau, N.; Primard, C.; Genin, C.; Perouzel, E.; Lioux, T.; Paul, S.; Verrier, B. Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* **2013**, *167*, 60–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Silva, J.M.; Videira, M.; Gaspar, R.; Pr eat, V.; Florindo, H.F. Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 179–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Akagi, T.; Baba, M.; Akashi, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv. Polym. Sci.* **2012**, *247*, 31–64.
22. Roth-Walter, F.; Sch oll, I.; Untersmayr, E.; Ellinger, A.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner, O.; Gabor, F.; Jensen-Jarolim, E. Mucosal targeting of allergen-loaded microspheres by Aleuria aurantia lectin. *Vaccine* **2005**, *23*, 2703–2710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Silva, J.M.; Zupancic, E.; Peres, C.; Silva, L.C.; Gaspar, R.; Pr eat, V.; Florindo, H.F. Immunomodulation against Microbial Pathogens Through Dendritic Cells. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science Technology and Education*; M endez-Vilas, A., Ed.; Badajoz, Spain, 2013; pp. 1686–1705.
24. Jain, S.; O’Hagan, D.T.; Singh, M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *10*, 1731–1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Banchereau, J.F.B. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 767–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Reddy, S.T.; van der Vlies, A.J.; Simeoni, E.; Angeli, V.; Randolph, G.J.; O’Neil, C.P.; Lee, L.K.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1159–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Morachis, J.M.; Mahmoud, E.A.; Almutairi, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 505–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yue, Z.G.; Wei, W.; Lv, P.P.; Yue, H.; Wang, L.Y.; Su, Z.G.; Ma, G.H. Surface Charge Affects Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2440–2446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Khalil, I.A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 32–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Scholzen, A.; Minigo, G.; David, C.; Apostolopoulos, V.; Mottram, P.L. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* **2006**, *40*, 1–9.
31. Manolova, V.; Flace, A.; Bauer, M.; Schwarz, K.; Saudan, P.; Bachmann, M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1404–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Reddy, S.T.; Rehor, A.; Schmoekel, H.G.; Hubbell, J.A.; Swartz, M.A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J. Control. Release* **2006**, *112*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Silva, A.L.; Rosalia, R.A.; Varypataki, E.; Sibuea, S.; Ossendorp, F.; Jiskoot, W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine* **2015**, *33*, 847–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Leleux, J.; Roy, K. Micro and nanoparticle-based delivery systems for vaccine immunotherapy: An immunological and materials perspective. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 72–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Joshi, V.B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. Biodegradable particles as vaccine antigen delivery systems for stimulating cellular immune responses. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2013**, *912*, 2584–2590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Meyer, R.A.; Green, J.J. Shaping the future of nanomedicine: Anisotropy in polymeric nanoparticle design. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 191–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Champion, J.A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4930–4934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Geng, Y.A.N.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Minko, T.; Discher, D.E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Doshi, N.; Prabhakarparandian, B.; Rea-Ramsey, A.; Pant, K.; Sundaram, S.; Mitragotri, S. Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: A study using model synthetic microvascular networks. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 196–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Cho, W.S.; Thielbeer, F.; Duffin, R.; Johansson, E.M.V.; Megson, I.L.; MacNee, W.; Bradley, M.; Donaldson, K. Surface functionalization affects the zeta potential, coronal stability and membranolytic activity of polymeric nanoparticles. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 202–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Han, R.; Zhu, J.; Yang, X.; Xu, H. Surface modification of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with protamine enhanced cross-presentation of encapsulated ovalbumin by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *96*, 142–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Petrizzo, A.; Conte, C.; Tagliamonte, M.; Napolitano, M.; Bifulco, K.; Carriero, V.; De Stradis, A.; Tornesello, M.L.; Buonaguro, F.M.; Quaglia, F.; et al. Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alloatti, A.; Kotsias, F.; Magalhaes, J.G.; Amigorena, S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: Timing matters! *Immunol. Rev.* **2016**, *272*, 97–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lamalle-Bernard, D.; Munier, S.; Compagnon, C.; Charles, M.H.; Kalyanaraman, V.S.; Delair, T.; Verrier, B.; Ataman-Önal, Y. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Control. Release* **2006**, *115*, 57–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Joffre, O.P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 557–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Saluja, S.S.; Hanlon, D.J.; Sharp, F.A.; Hong, E.; Khalil, D.; Robinson, E.; Tigelaar, R.; Fahmy, T.M.; Edelson, R.L. Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 5231–5246. [[PubMed](#)]
47. Demento, S.L.; Cui, W.; Criscione, J.M.; Stern, E.; Tulipan, J.; Kaech, S.M.; Fahmy, T.M. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4957–4964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hirosue, S.; Kourtis, I.C.; van der Vlies, A.J.; Hubbell, J.A.; Swartz, M.A. Antigen delivery to dendritic cells by poly(propylene sulfide) nanoparticles with disulfide conjugated peptides: Cross-presentation and T cell activation. *Vaccine* **2010**, *28*, 7897–7906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hubbell, J.A.; Thomas, S.N.; Swartz, M.A. Materials engineering for immunomodulation. *Nat. Rev.* **2009**, *462*, 449–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Coffman, R.L.; Sher, A.; Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **2010**, *33*, 492–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hoffmann, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A.; Ezekowitz, R.A.B. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **1999**, *284*, 1313–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gutjahr, A.; Tiraby, G.; Perouzel, E.; Verrier, B.; Paul, S. Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 573–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Alexopoulou, L.; Holt, A.C.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* **2001**, *413*, 732–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Reed, S.G.; Hsu, F.C.; Carter, D.; Orr, M.T. The science of vaccine adjuvants: Advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **2016**, *41*, 85–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Diebold, S.S. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 813–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pohar, J.; Krajnik, A.K.; Jerala, R.; Bencina, M. Minimal Sequence Requirements for Minimal Sequence Requirements for Oligodeoxyribonucleotides Activating Human TLR9. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3901–3908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Bentala, H.; Verweij, W.R.; Huizinga-Van der Vlag, A.; van Loenen-Weemaes, A.M.; Meijer, D.K.F.; Poelstra, K. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock* **2002**, *18*, 561–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Margaroni, M.; Agallou, M.; Kontonikola, K.; Karidi, K.; Kammona, O.; Kiparissides, C.; Gaitanaki, C.; Karagouni, E. PLGA nanoparticles modified with a TNF α mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *105*, 18–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wischke, C.; Mathew, S.; Roch, T.; Frentsch, M.; Lendlein, A. Potential of NOD receptor ligands as immunomodulators in particulate vaccine carriers. *J. Control Release* **2012**, *164*, 299–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hamdy, S.; Molavi, O.; Ma, Z.; Haddadi, A.; Alshamsan, A.; Gobti, Z.; Elhasi, S.; Samuel, J.; Lavasanifar, A. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine* **2008**, *26*, 5046–5057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Mueller, M.; Reichardt, W.; Koerner, J.; Groettrup, M. Coencapsulation of tumor lysate and CpG-ODN in PLGA-microspheres enables successful immunotherapy of prostate carcinoma in TRAMP mice. *J. Control. Release* **2012**, *162*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Rahimian, S.; Franssen, M.F.; Kleinovink, J.W.; Christensen, J.R.; Amidi, M.; Hennink, W.E.; Ossendorp, F. Polymeric nanoparticles for co-delivery of synthetic long peptide antigen and poly IC as therapeutic cancer vaccine formulation. *J. Control. Release* **2015**, *203*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Tacke, P.J.; Zeelenberg, I.S.; Cruz, L.J.; Van Hout-Kuijter, M.A.; Van De Glind, G.; Fokink, R.G.; Lambeck, A.J.A.; Figdor, C.G. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood* **2011**, *118*, 6836–6844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Dhodapkar, M.V.; Sznol, M.; Zhao, B.; Wang, D.; Carvajal, R.D.; Keohan, M.L.; Chuang, E.; Sanborn, R.E.; Lutzky, J.; Powderly, J.; et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 232–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Cruz, L.J.; Rosalia, R.A.; Kleinovink, J.W.; Rueda, F.; Löwik, C.W.; Ossendorp, F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8+ T cell response: A comparative study. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 209–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Siefert, A.L.; Caplan, M.J.; Fahmy, T.M. Artificial bacterial biomimetic nanoparticles synergize pathogen-associated molecular patterns for vaccine efficacy. *Biomaterials* **2016**, *97*, 85–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kasturi, S.P.; Skountzou, I.; Albrecht, R.A.; Koutsonanos, D.; Hua, T.; Nakaya, H.I.; Ravindran, R.; Stewart, S.; Alam, M.; Kwissa, M.; et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* **2011**, *470*, 543–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. De Titta, A.; Ballester, M.; Julier, Z.; Nembrini, C.; Jeanbart, L.; Van Der Vlies, A.J.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19902–19907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lynn, G.M.; Laga, R.; Darrach, P.A.; Ishizuka, A.S.; Balaci, A.J.; Dulcey, A.E.; Pechar, M.; Pola, R.; Gerner, M.Y.; Yamamoto, A.; et al. In vivo characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 1201–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ilyinskii, P.O.; Roy, C.J.; O’Neil, C.P.; Browning, E.A.; Pittet, L.A.; Altreuter, D.H.; Alexis, F.; Tonti, E.; Shi, J.; Basto, P.A.; et al. Adjuvant-carrying synthetic vaccine particles augment the immune response to encapsulated antigen and exhibit strong local immune activation without inducing systemic cytokine release. *Vaccine* **2014**, *32*, 2882–2895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Hanson, M.C.; Crespo, M.P.; Abraham, W.; Moynihan, K.D.; Szeto, G.L.; Chen, S.H.; Melo, M.B.; Mueller, S.; Irvine, D.J. Nanoparticulate STING agonists are potent lymph node—targeted vaccine adjuvants. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 2532–2546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Heit, A.; Schmitz, F.; Haas, T.; Busch, D.H.; Wagner, H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 2063–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Shima, F.; Uto, T.; Akagi, T.; Akashi, M. Synergistic stimulation of antigen presenting cells via tlr by combining CpG ODN and Poly(g-glutamic acid)-based nanoparticles as vaccine adjuvants. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 926–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bruno, C.; Agnolon, V.; Berti, F.; Bufali, S.; O’hagan, D.T.; Baudner, B.C. The preparation and characterization of PLG nanoparticles with an entrapped synthetic TLR7 agonist and their preclinical evaluation as adjuvant for an adsorbed DTaP vaccine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *105*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Demento, S.L.; Bonafé, N.; Cui, W.; Kaech, S.M.; Caplan, M.J.; Fikrig, E.; Ledizet, M.; Fahmy, T.M. TLR9-Targeted Biodegradable Nanoparticles as Immunization Vectors Protect against West Nile Encephalitis. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 2989–2997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hamdy, S.; Elamanchili, P.; Alshamsan, A.; Satou, T.; Samuel, J. Enhanced antigen-specific primary CD4+ and CD8+ responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2015**, *33*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lee, C.K.; Lee, Y.R.; Lee, Y.H.; Kim, K.H.; Im, S.A. Induction of Potent Antigen-specific Cytotoxic T Cell Response by PLGA-nanoparticles Containing Antigen and TLR Agonist. *Immune. Netw.* **2013**, *13*, 30–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

78. Silva, J.M.; Zupancic, E.; Vandermeulen, G.; Oliveira, V.G.; Salgado, A.; Videira, M.; Gaspar, M.; Graca, L.; Pr at, V.; Florindo, H.F. In vivo delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model. *J. Control. Release* **2015**, *198*, 91–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Fischer, S.; Schlosser, E.; Mueller, M.; Csaba, N.; Merkle, H.P.; Groettrup, M.; Gander, B. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J. Drug Target.* **2009**, *17*, 652–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



  2016 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine Vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion

Julien Rességuier¹, Emilie Delaune¹, Anne-Line Coolen¹, Jean-Pierre Levrud², Pierre Boudinot³, Dominique Le Guellec¹ and Bernard Verrier^{1*}

¹Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Lyon, France, ²Macrophages et Développement de l'Immunité, Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France, ³Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Mats Bemak,
University of Gothenburg, Sweden

Reviewed by:

Antonio Figueras,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain
Alan John Young,
South Dakota State University, USA

*Correspondence:

Bernard Verrier
bernard.verrier@ibcp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Mucosal Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 22 November 2016

Accepted: 09 February 2017

Published: 27 February 2017

Citation:

Rességuier J, Delaune E, Coolen A-L,
Levrud J-P, Boudinot P,
Le Guellec D and Verrier B (2017)
Specific and Efficient Uptake of
Surfactant-Free Poly(Lactic Acid)
Nanovaccine Vehicles by Mucosal
Dendritic Cells in Adult Zebrafish
after Bath Immersion.
Front. Immunol. 8:190.
doi: 10.3389/fimmu.2017.00190

Activation of mucosal immunity is a key milestone for next-generation vaccine development. Biocompatible polymer-based nanoparticles (NPs) are promising vectors and adjuvants for mucosal vaccination. However, their *in vivo* uptake by mucosae and their biodistribution in antigen-presenting cells (APCs) need to be better understood to optimize mucosal nanovaccine designs. Here, we assessed if APCs are efficiently targeted in a spontaneous manner by surfactant-free poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) after mucosal administration. Combining histology and flow imaging approaches, we describe and quantify the mucosal uptake of 200 nm PLA-NPs in adult zebrafish. Following bath administration, PLA-NPs penetrated and crossed epithelial barriers from all exposed mucosae. In mucosae, PLA-NPs accumulated in APCs, which were identified as dendritic cells (DCs), macrophages, and IgZ⁺ B cells in gills and skin. PLA-NP uptake by phagocytes was specific to these cell types, as PLA-NPs were not detected in neutrophils. Importantly, quantitative analyses in gills revealed that DCs take up PLA-NPs with specifically high efficiency. This study shows that surfactant-free PLA-NPs, which display optimal biocompatibility, can spontaneously target DCs with high efficiency *in vivo* following mucosal administration, and highlights PLA-NPs as powerful platforms for mucosal vaccine delivery in the medical and veterinary fields, and particularly in aquaculture.

Keywords: poly(b,L-lactic acid) nanoparticles, surfactant free, zebrafish, vaccines carrier, mucosal delivery, dendritic cells, imaging flow cytometry, biodistribution

INTRODUCTION

Mucosae represent the first defensive barriers of the organism against most pathogens. Their defenses rely not only on physical barriers such as mucus production and mono- or multi-layered epithelia but also on specific immune systems called mucosa-associated lymphoid tissues (MALTs). The local activation of MALTs is currently a major challenge in vaccinology, both for human and veterinary medicine (1–3). In the fish farming industry, mucosal vaccines raise a growing interest compared to injected ones, as they offer wider possibilities for immunizing young fish, are easier to administer

to large animal numbers, and cause less stress and tissue damage (4). As soluble antigens are poor mucosal immune inducers by themselves, extensive efforts have been made to develop particulate vaccine carriers able to cross the mucus and epithelial layers constituting mucosal barriers and deliver antigens to the key initiators of immune response, the antigen-presenting cells (APCs) (2, 3).

Some of the most promising vaccine vehicles for mucosal delivery are biodegradable polymeric nanoparticles (NPs), in particular NPs based on poly(D,L-lactic acid) (PLA) and its copolymer poly(lactic acid co-glycolic acid) (PLGA) (5, 6). PLA and PLGA are Food and Drug Administration-approved biocompatible lactate-based polyesters, which present high safety records, can be completely resorbed in the body by metabolization of their degradation products, are easy to produce and are eco-compatible (7). PLA- and PLGA-NPs constitute versatile vectors for adsorbing and/or encapsulating antigenic peptides and immunostimulant drugs (8, 9). They have been shown to induce immune responses against various model antigens following parenteral administration in mammals (2, 8). Their mucosal administration has also revealed their ability to cross mucosal barriers, reach some APCs, and elicit mucosal immune responses (6, 10–12). In fish, submicron PLGA particles have shown encouraging effects of immune response enhancement, following administration by injection and oral routes (9). However, a detailed understanding of *in vivo* uptake and biodistribution of polymeric NPs following mucosal administration is still lacking, which has limited their development as mucosal vaccine vehicles in vertebrates, and more particularly in fish. Here, we analyze if polymeric NPs efficiently cross fish mucosal barriers and reach APCs *in vivo*, using surfactant-free 200 nm poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) as a model. PLA-NPs were prepared without any surfactant, for optimal biocompatibility (13). Because NPs generally become quickly coated by proteins and factors present in biological media (14), this model is likely representative of a variety of NPs which surface is functionalized using targeting or antigenic proteins.

We performed this study in adult zebrafish (*Danio rerio*), a teleost fish model well suited for analyzing whole-body biodistribution with a cellular level of resolution, and benefiting from a rising number of available transgenic lines and molecular markers of immune cell types (15–17). The major lymphoid organs of teleosts are the kidney marrow, which is the site of hematopoiesis, the thymus and the spleen (18). Like other teleosts, zebrafish lack lymph nodes and display a diffuse lymphoid tissue organization in mucosae (4, 19). Zebrafish adaptive immune system becomes fully competent at juvenile stage (15, 20). They have three classes of immunoglobulins, M, D, and Z (called T in other teleosts), IgZ/T being the functional equivalent of mammalian mucosal IgA (21). Professional APCs such as macrophages, dendritic cells (DCs), and B cells have all been identified in zebrafish. Although it was in teleosts that the phagocytic ability of B cells was first recognized, it is still unclear if fish APCs fulfill similar roles to their mammalian counterparts in the initiation of adaptive immune responses (22, 23). Yet, DC cells capable of phagocytosis and T-cell stimulation were identified in zebrafish kidney marrow, and conserved co-stimulatory molecules (CD80/CD86

and CD83) have been detected in T-cell stimulating cells, further supporting a conservation of DC function in fish (24–26).

Main mucosae of adult teleosts are found in the gut, gills, skin, and nose; their MALTs are accordingly sub-divided into gut-, gill-, skin-, and nose-associated lymphoid tissues (GALT, GIALT, SALT, and NALT, respectively) (19, 21). Most leukocyte types are present in fish MALTs, including phagocytes (neutrophils, macrophages, DCs, and B cells), T cells, and plasma cells.

Here, we analyzed the biodistribution of PLA-NPs administered to adult zebrafish by immersion, a straightforward administration method targeting gut, gills, skin, and nasal mucosae altogether. We show that *in vivo*, surfactant-free PLA-NPs naturally penetrate and cross the mucosal epithelial barriers with high efficiency and are specifically accumulated in mucosal APCs, and not in neutrophils. Quantification in the gills reveals that DCs are the major APC type taking up PLA-NPs, with up to 65% being detected as positive for NPs. Our results suggest that active targeting strategies are not necessarily required for efficient uptake of polymeric NPs by mucosal DCs, and further highlight the potential of PLGA- and PLA-NPs as mucosal vaccine vehicles for applications in aquaculture.

MATERIALS AND METHODS

NP Preparation and Characterization

Poly(lactic acid) nanoparticles were produced as previously described (10, 27). The red CellTrace BODIPY TR Methyl Ester (TM) or green BODIPY 500/510 C4, C9 (TM) fluorophores (Life Technologies) were encapsulated using a fluorophore:PLA ratio of 0.04% w/w. The NP size and size polydispersity were determined by diffuse light scattering using a Zetasizer nanoS apparatus (Malvern Instrument, UK).

Fish Stocks, NP Administration, and Ethic Statement

Experiments were performed on wild-type AB/Tubingen zebrafish and transgenic *Tg(mhc2dab:GFP)sd6* (25), *Tg(mpeg1:mCherry)gl23* (28), *Tg(mpx:GFP)i114* (29), and *Tg(fli1:GFP)y1* (30) lines. Adults were individually immersed for 24 h at 28°C in 100 mL of fresh fish facility water, containing 0.01 or 0.05% fluorescent PLA-NPs. The experiments were conducted in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French law, and the protocols were approved by the local Animal Ethic Evaluation Committee (No. CE015: Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4—CECCAPP).

Histology

Animals exposed to red NPs were euthanized by tricaine overdose, fixed in 4% PFA for 24 h at 4°C, then immersed in 30% sucrose for several days, embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA), flash frozen in isopentane, and sectioned using a CM3050 S cryostat (Leica). DCs were stained using 1:50 FITC conjugate peanut agglutinin (FITC-PNA) (US Biological). Macrophage, neutrophil, and IgZ⁺ were stained using 1:250 rabbit

anti-Mpeg1, 1:50 rabbit anti-Mpx, and 1:500 rabbit anti-IgZ-IN2 antibodies (AnaSpec), respectively, and 1:250 cross-adsorbed goat anti-rabbit secondary antibody (Thermo Fisher), which were either conjugated to DyLight 488 (for IgZ staining) or to DyLight 633 (for Mpx and Mpeg1 stainings). For double staining, cryosections were saturated with 5% BSA between FITC-PNA and antibody labeling. No cross staining was observed for PNA/IgZ labeling, while a weak PNA signal could be detected in a few Mpeg1⁺ macrophages. Mpx⁺ neutrophils consistently displayed moderate PNA signal, but distinct from DCs, which displayed high granular intracytoplasmic PNA staining and were Mpx⁻. Cryosections were co-stained with DyLight 488-Phalloidin (Thermo Fisher) and DAPI (Euromedex) and analyzed using a SP5 upward confocal microscope (Leica) with 63×/1.4NA objective and ImageJ.

Flow Cytometry

The organs from euthanized animals (exposed to red PLA-NPs) were collected in cold PBS/heparin (1 U/mL)/FBS (2%). Cell suspensions from brain, gill, liver, spleen, and kidney were directly homogenized by passing through a 40- μ m mesh filter (Fisherbrand). Skin and gut samples were dissociated for 8 min in 0.2% porcine trypsin (Sigma-Aldrich) in Versene solution (Life Technologies) before mesh filtration. Washed cell suspensions were treated with DAPI (2.5 μ g/mL) to mark dead cells and processed using a LSRII Flow Cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo v7.6.5.

Imaging Flow Cytometry for Internalization Score

Cell suspensions, prepared as described above, were stained with 1:500 CellMask Green Plasma Membrane Stain (Life Technologies), treated with DAPI (10 μ g/mL), and analyzed using an ImageStream^x Mark II imaging flow cytometer (Amnis, Millipore) with 63× objective, and IDEAs software. Cells with NP signal peaking at least sevenfolds over background were selected, and their cytoplasmic area (excluding membrane) was automatically determined based on CellMask signal. The internalization score, reflecting the ratio of cytoplasmic to total brightness intensity, was computed for each cell using a built-in IDEAs function. As a negative control for NP internalization, cell suspensions from unexposed fish were incubated with 0.002% red NPs for 30 min at 4°C.

Imaging Flow Cytometry for Quantification of NP Uptake

For macrophages and neutrophils identification, cell suspensions were prepared from gills of *Tg(mpeg1:mCherry)gl23* or *Tg(mpx:GFP)i114* adults exposed to 0.05% green or red NPs (respectively); dead cells were marked using DAPI. For DC and IgZ⁺ cell staining, cell suspensions were prepared from gills of wild-type zebrafish exposed to red NPs, marked using 1:1,000 LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher) and fixed/permeabilized using 2% PFA/0.1% triton X-100. DCs were stained using 1:2,000 FITC-PNA in absence of FBS. IgZ⁺ cells were stained using 1:2,000 rabbit anti-IgZ (AnaSpec) and 1:2,000

DyLight488 conjugate cross-adsorbed goat anti-rabbit antibodies (Thermo Fisher). Samples were analyzed using ImageStream^x (50,000–100,000 events per acquisition) and IDEAs software. For DCs gating, events displaying the highest level of PNA staining were selected, from which cells devoid of an intracellular PNA signal or presenting a thick capsid (a hallmark of rodlet cells) were excluded.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6. Normality of samples was tested using Agostino and Pearson omnibus normality test. For flow cytometry experiments, one-way ANOVA coupled with Bonferroni multiple comparison *post hoc* analysis was carried on populations that passed the normality test (gills, skin, and kidneys). On populations that failed the normality assay (liver), the non-parametric equivalent Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison *post hoc* analysis was used. For flow imaging experiments, as none of the populations respected the normality, a one-sided Mann–Whitney test was performed. Significance level is indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

RESULTS

PLA-NP Characterization

Poly(lactic acid) nanoparticles were produced by nanoprecipitation, a single step process whereby acetone-dissolved PLA is precipitated into a swirling aqueous phase of water and ethanol, in absence of surfactant. To detect PLA-NP by fluorescence imaging, red or green fluorescent dyes were encapsulated in NPs, by mixing the dyes with acetone. For optimal NP biocompatibility, water and acetone solvents were evaporated in the final product to a residual concentration well below 5,000 ppm, in accordance with European pharmacopeia standards. Red and green PLA-NPs displayed mean diameters of 225 and 200 nm, respectively, and were highly homogeneous in size within a batch, as shown by scanning electron microscopy and by diffuse light scattering indicating a low polydispersity index (Table 1; Figure S1 in Supplementary Material). Fluorophore-loaded PLA-NPs had a typical zeta potential of -60 mV.

PLA NPs Are Taken Up by Epithelial Cells of All Targeted Mucosae

To study the mucosal uptake of PLA-NPs *in vivo*, we immersed zebrafish for 24 h in a bath containing 0.01% red NPs. This administration method targets gills, skin, nasal mucosa, and

TABLE 1 | Nanoparticle (NP) characteristics.

NP	Fluorophore	Mean diameter (nm)	Polydispersity index
Red fluorescent—poly(D,L-lactic acid) (PLA)	CellTrace BODIPY TR methyl ester	225.4 \pm 4.6	0.04 \pm 0.01
Green fluorescent—PLA	BODIPY 500/510 C4, C9	199.9 \pm 2.5	0.05 \pm 0.01

gut altogether and involves minimal manipulation that could be stressful to the fish or damaging to the tissues; indeed, the treatment did not cause more detectable stress than the transient increase of opercular breathing rhythm typically caused by netting and transfer of the fish from one tank to another. To determine PLA-NP biodistribution at whole-body level, NP localization was first analyzed by histological approaches, using confocal imaging of 40- μm -thick longitudinal whole-body cryosections. Images were taken within the core of cryosections, which allowed us to avoid the top and bottom edges of cryosections where we observed artifactual displacement of PLA-NPs related to cryosectioning and slide immersion (Figure S2 in Supplementary Material).

We first investigated if PLA-NPs were taken up by epithelial cells of mucosae primarily exposed to NPs. In all these tissues, NPs were found in epithelial cells bordering the external environment (Figure 1). The gills, which have a gas-exchange function, typically display an extremely branched architecture of primary lamellae supporting secondary lamellae, which each consist in a network of capillaries sustained by endothelial pillar cells and covered by a non-keratinized squamous epithelium. PLA-NPs were detected in the epithelium lining the branchial cavity, and more specifically in pavement cells, identified by their typical actin microridges (Figure 1A). Located just below the gill cavity epithelium, the fish thymus may also be primarily exposed to NPs upon immersion administration (31). Indeed, we detected NPs in the outermost layer of pharyngeal epithelial cells covering the thymus (Figure 1B). The fish skin, unlike in mammals, is considered a mucosa: its outermost layer is made of living and proliferating cells coated with mucus and mucosal IgZ/T antibodies (32). The epithelial cells form a stratified non-keratinized epidermis, interspersed with pores located over various types of mucus-secretory cells. We detected PLA-NPs both in keratinocytes and in goblet cells (Figure 1C). As in mammals, the fish gut displays a single epithelial layer mainly composed of brush-bordered enterocytes and mucus-producing goblet cells, supported by folds of connective *lamina propria* (33). We detected PLA-NPs in enterocytes throughout the intestine (Figures 1D–E), with a particularity in the post-midgut, where a high concentration of NPs was observed in supranuclear vacuoles of so-called specialized enterocytes, which were described as a functional equivalent of the antigen-sampling mammalian M-cells (34, 35) (Figure 1E). NPs were also observed in the nasal mucosa, in cells of the ciliated pseudostratified columnar epithelium (Figure 1F). Thus, despite the mucus layer covering mucosal epithelia, PLA-NPs reached and were taken up by epithelial cells of all exposed mucosae.

PLA NPs Cross Mucosal Epithelial Barriers and Reach Mucosal APCs

We then analyzed if PLA-NPs were able to cross epithelial barriers to reach mucosal APCs, in cryosections. We detected NP accumulations in cells located in the deeper layers of the skin and the gills, in the *lamina propria* of the gut, in the lympho-reticular parenchyma of the thymus and in the nasal *lamina* (Figure 1). In the post-midgut, NPs were also found translocated at the basal

boundaries of specialized enterocytes (Figure 1D). A variety of leukocytes, including phagocytes, are present in deep epithelial and sub-epithelial areas (19). The pattern of NP accumulations suggested that these NP-positive cells could be phagocytes.

To identify these cells, we labeled gills and skin cryosections using specific markers, such as Mpx and Mpeg1, expressed in neutrophils and macrophages, respectively (28, 29). IgZ staining was used to identify cells of the B-cell lineage specialized in mucosae protection, as described in trout (36). The identification of DCs was performed based on their affinity for PNA, a surface marker of live DCs (24). In fixed, permeabilized cryosections, cells with the highest PNA⁺ signal exhibited a granular intracytoplasmic staining and cellular protrusions reminiscent of dendrites. They displayed a strong MHC class 2 staining in transgenic *mhc2dab:EGFP* fish (Figure S3 in Supplementary Material) and were negative for Mpeg1 and IgZ stainings (Figure 2), further suggesting that these are DCs.

Following PLA-NP exposure, DCs displayed a strong uptake of NPs in gills (Figures 2A,B), as well as in skin (Figure 2D). In gills, PLA-NPs were also observed in a number of macrophages (Figure 2B) and less frequently in IgZ⁺ cells (Figure 2C). Interestingly, no NPs were detected in neutrophils (Figure 2A).

PLA NPs Enter the Bloodstream

In addition to their accumulation in APCs, we detected scattered PLA-NPs in the circulatory system, as seen in blood vessels of the primary lamellae in gills (Figure 1A). Immersion exposure of transgenic *fli:GFP* adult zebrafish to fluorescent NPs at higher concentrations (0.05%) revealed not only numerous PLA-NPs in the gill bloodstream (Figure 3) but also NP internalization in endothelial cells (Figures 3B,B'). Thus, PLA-NPs cross mucosae and enter the bloodstream, suggesting that NPs may also reach internal organs.

Indeed, NP accumulations were observed in liver cells close to sinusoids (Figure 3C). These cells, which displayed an oblong nucleus distinct from the round shaped nucleus with scattered chromatin of hepatocytes, may correspond to macrophages or hepatic stellate (Ito) cells (37, 38). NPs were never detected in brain, spleen, or kidney cryosections.

PLA NPs Penetrate the Organism in a Dose-Dependent Manner and Reach Liver and Kidney

To quantify the PLA-NP uptake in primary and secondary exposure organs, we performed flow cytometry on dissociated cells of various candidate organs, which were dissected from fish exposed for 24 h to 0.01 or 0.05% fluorescent NPs by immersion (Figures 4A–C). Consistent with confocal observations, gills and skin displayed 0.86 and 0.65% NP-positive cells, respectively, following 0.01% NP exposure. A dose-dependent uptake was observed in these organs, among which the proportion of NP-positive cells tripled (2.5 and 2.1%, respectively), for 0.05% NP exposure. Quantification of NP uptake by this approach was, however, not applicable to intestines, due to the large number of debris corresponding to mucus and intestinal content loaded with NPs (not shown).

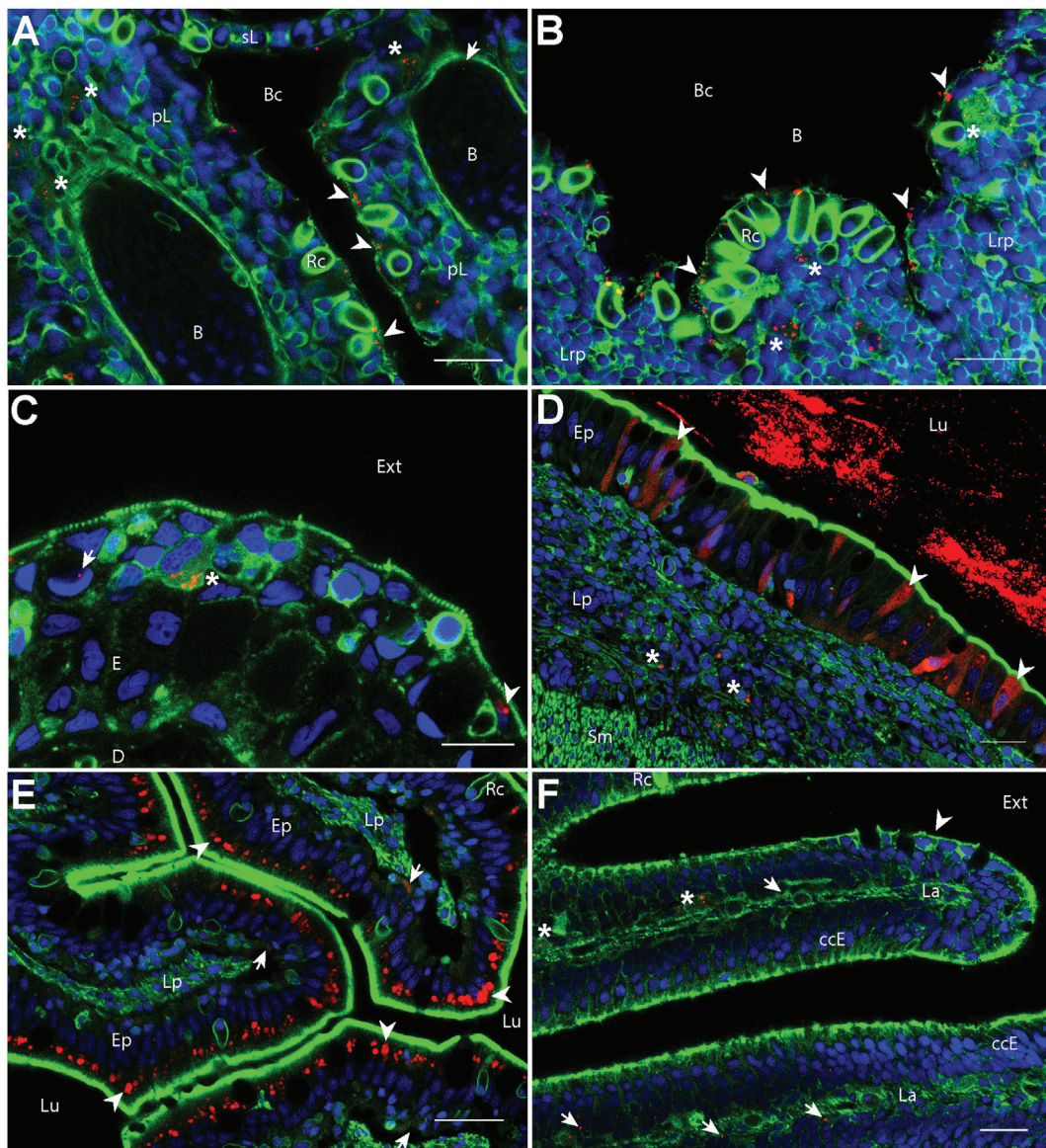


FIGURE 1 | Biodistribution of poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) in mucosae and thymus. Representative confocal images of gills (A), thymus (B), skin (C), intestines (D,E), and the olfactory mucosa (F), of wild-type adults immersed for 24 h in 0.01% red fluorescent nanoparticles (NPs). Images were acquired in 40- μ m-thick whole-body cryosections, stained with phalloidin (green) and DAPI (blue). (A) In gills, NPs are found in pavement cells lining the branchial cavity (arrowheads), accumulated in cells located in the sub-epithelial compartment (stars), and detected in the blood (arrow). (B) NPs are located in pavement cells lining the branchial cavity above the thymus (arrowheads) and accumulated in cells of the lympho-reticular parenchyma in the thymus (stars). (C) In skin, NPs are visible in keratinocytes (arrowhead), goblet cells (characterized by kidney-shaped nucleus, arrow) and accumulated in intra-epithelial cells (star). (D,E) In the intestine, a high number of NPs is found inside the intestinal lumen (D). As illustrated in the end-gut (D), NPs are taken up by enterocytes (arrowheads), which display a diffuse signal. A number of NPs is also observed in sub-epithelial cells (stars). In the post-midgut (E), NPs are mainly found in apical areas of specialized enterocytes (arrowheads); a subset is also found at the basal epithelial side (arrows). (F) In the nasal mucosa, NP-positive cells are found in the olfactory epithelium (arrowhead) and the lamina (arrows). NPs are accumulated in large cells of the lamina (stars). B, blood vessels; pL, primary lamellae; sL, secondary lamellae; Bc, branchial cavity; Rc, rodlet cells; E, epidermis; D, dermis; Ext, external environment; Lu, Lumen; Ep, epithelium; Lp, lamina propria; Sm, smooth muscles; Lrp, lympho-reticular parenchyma; La, lamina. Scale bar: 10 μ m (B,E), 20 μ m (A,C,F), and 30 μ m (D).

Regarding internal organs, flow cytometry analysis corroborated the absence of NP uptake in the brain and the spleen observed by histology approaches. In kidney, however, a small population of NP-positive cells was detected by flow cytometry, increasing with NP concentration, but reaching only 0.16% at

the highest NP concentration (Figure 4C). Consistent with histological observations, a higher mean of 3.5% positive cells was detected by flow cytometry in the liver for 0.01% NP exposure. Contrary to other organs, the proportion of liver NP-positive cells showed no significant difference between the two PLA-NP

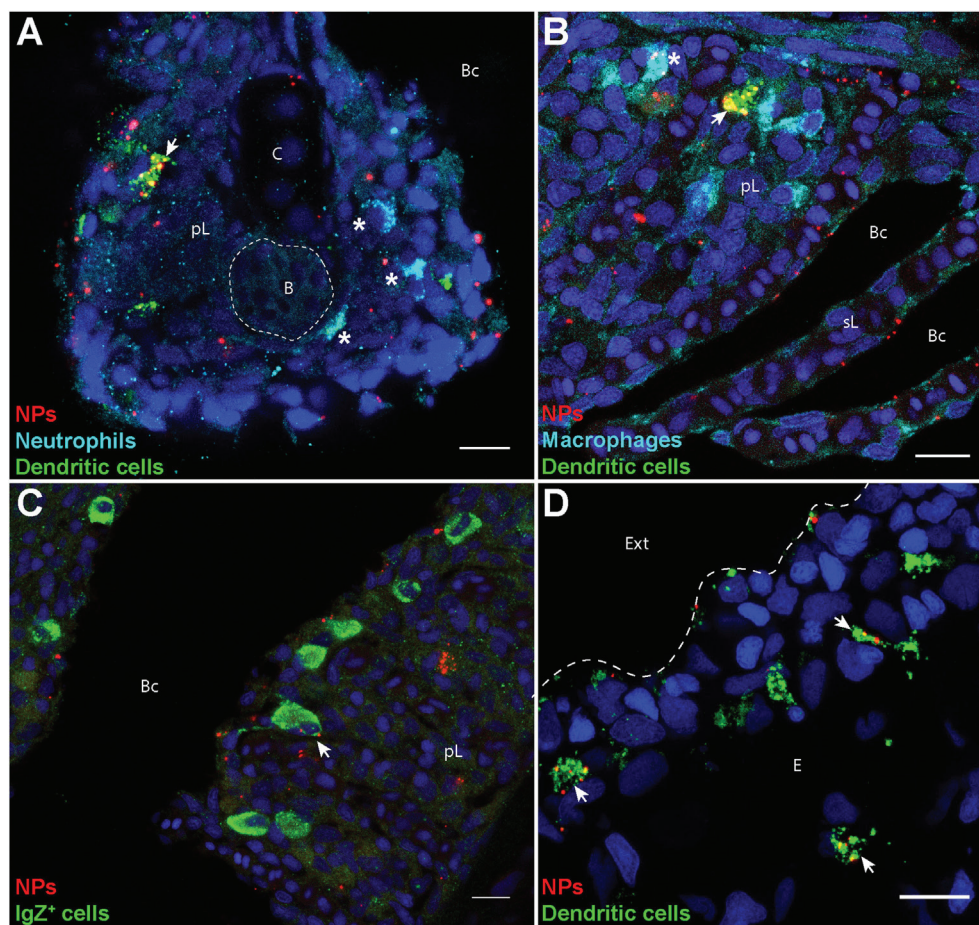


FIGURE 2 | Poly(lactic acid) nanoparticles (PLA-NPs) are accumulated in mucosal antigen-presenting cells. (A–D) Representative confocal images of gills (A–C) and skin (D) of wild-type adults immersed for 24 h in 0.01% fluorescent PLA-NPs (red). Images were acquired from 40- μ m-thick whole-body cryosections, stained for neutrophils (Mpx-positive, cyan) (A), macrophages (Mpeg1-positive, cyan) (B), IgZ⁺ B-cells (green) (C), and dendritic cells (DCs) (PNA, green) (A,B,D), in addition to nuclei (DAPI, blue). Maximal intensity projections from 3 (A–C) or 5 (D) optic sections acquired every micrometer. Nanoparticle (NP) accumulations are observed in gill DCs [(A,B), arrows], macrophages [(B), star], and IgZ⁺ cells [(C), arrow], while no NP are detected in neutrophils [(A), stars]. NP are also taken up by a network of skin DCs [(D), arrows]. pL, primary lamellae; sL, secondary lamellae; Bc, branchial cavity; B, blood; C, cartilage; Ext, external environment; E, epidermis. Scale bar: 10 μ m.

concentrations, suggesting that liver capacity may be reached at low NP concentration, as least in term of cell number.

PLA NPs Are Actively Internalized and Accumulate in Kidney Cells with Myeloid Cell Features

Because flow cytometry does not allow discrimination of true NP internalization events from cases where NPs are simply stuck on the plasma membrane, we performed imaging flow cytometry to clarify this point. Single cells isolated from fish exposed to 0.05% PLA-NPs displayed a clear intracellular NP localization, as revealed by the use of a plasma membrane marker, and illustrated in kidney cell suspensions (Figures 5A,B). The signal pattern was different when cells were exposed *in vitro* to PLA-NPs under conditions that block internalization (4°C), where NPs were seen aside cells or stuck on their plasma membrane

(Figure 5C). This was quantified by computing internalization scores based on a large number of single cells (Figure 5A). Altogether, PLA-NP internalization score was 1,000 times higher for cells of NP-exposed fish, than for the 4°C control. These data not only validate the consistency of our previous flow cytometry results but also reveal that PLA-NPs are actively taken up in cells of primary and secondary organs, following fish immersion.

Interestingly, as for the large gill cells with NP accumulations, the NP-positive kidney cells displayed cellular processes reminiscent of dendrites (Figures 5B,D), suggesting that these might be myeloid cells and possibly DCs.

DCs Are the Major Mucosal APCs Taking Up NPs *In Vivo*

The spontaneous targeting of PLA-NPs to APCs after mucosal administration (Figure 2) unveiled their promising potential as

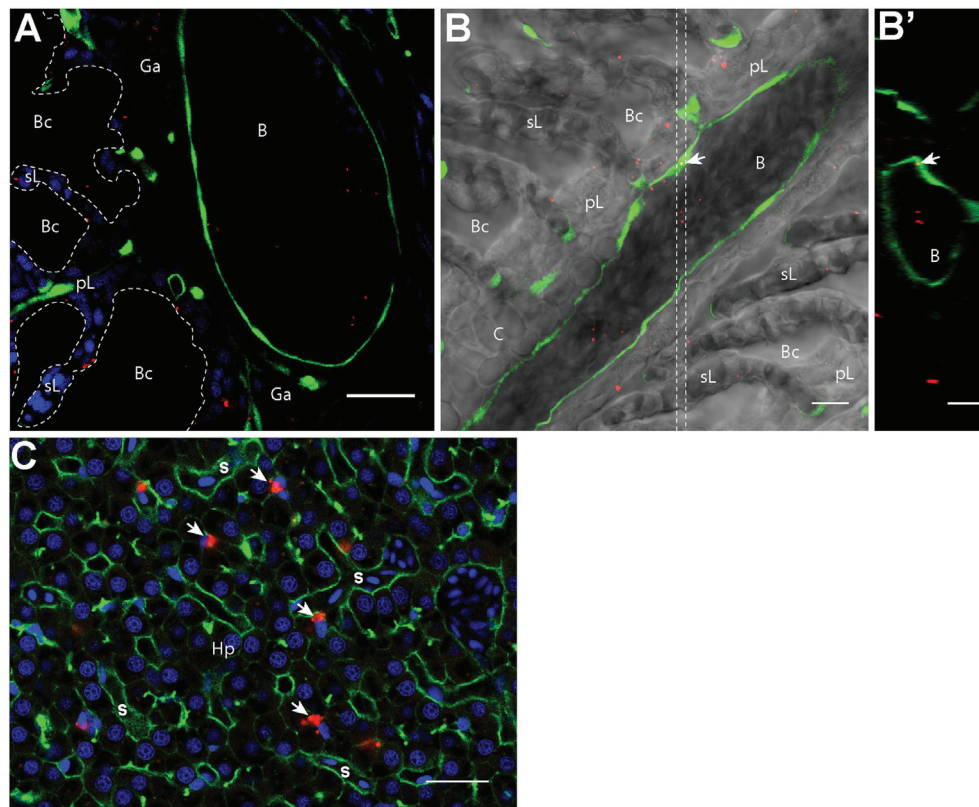


FIGURE 3 | Nanoparticles (NPs) reach the circulatory system and the liver. (A,B') Representative confocal images of gills from transgenic *fli:GFP* adults bathed for 24 h in 0.05% red fluorescent NPs. Images were acquired in 40- μ m-thick whole-body cryosections, stained with DAPI [blue in (A)]. NPs are found in the lumen of gill arch (A) and gill filament (B) blood vessels, which are delimited by green endothelial cells. NPs were also detected inside endothelial cells [arrow in (B)]. (B') These observations are confirmed by the orthogonal view realized in the area between the two dotted lines in (B). (C) Representative confocal image of the liver of wild-type adults exposed to 0.01% red fluorescent NPs. Images were acquired in 40- μ m-thick whole-body cryosections, stained with phalloidin (green) and DAPI (blue). NPs are highly concentrated in cells close to sinusoids (s) and displaying an oblong nucleus (arrows). pL, primary lamellae; sL, secondary lamellae; Bc, branchial cavity; B, blood vessel; Ga, gill arch; C, cartilage; Hp, hepatocytes. Scale bar: 10 μ m (B,B'), 20 μ m (A,C).

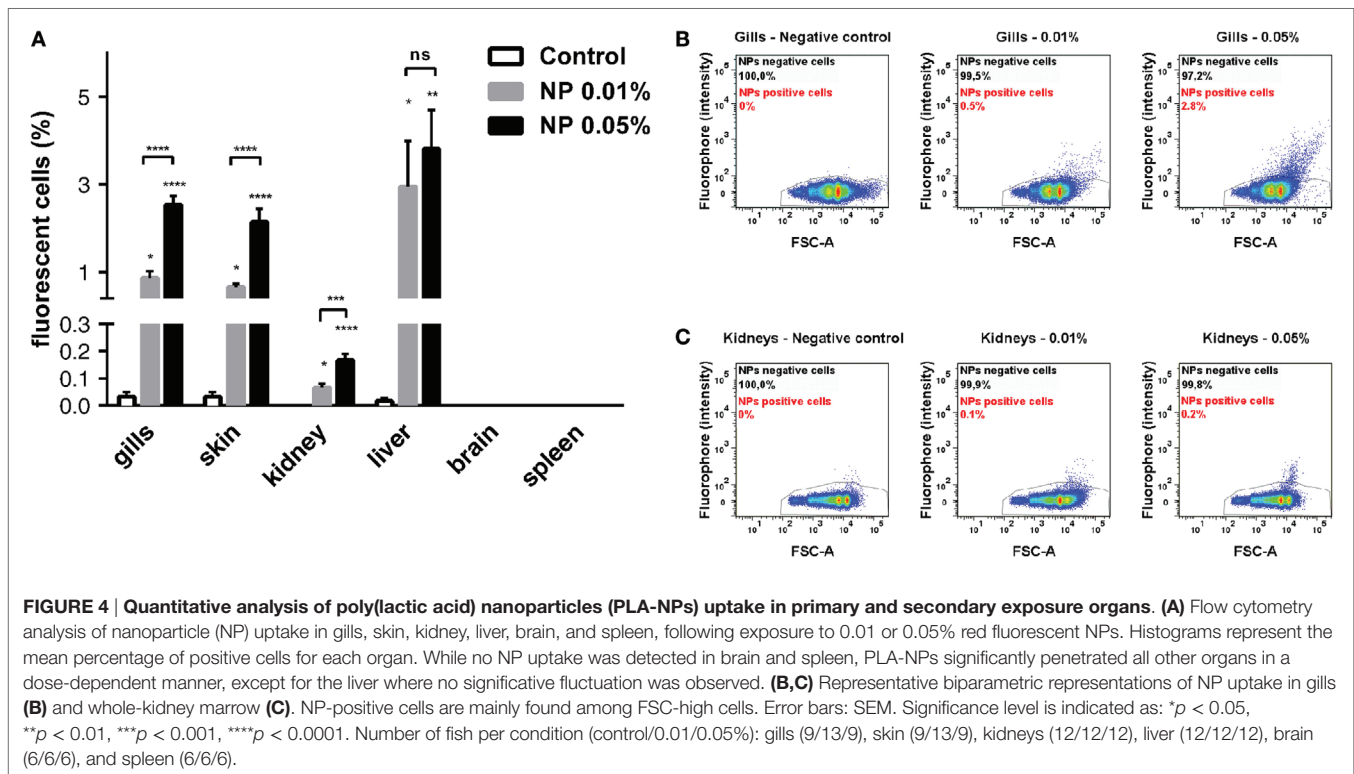
mucosal vaccine vectors. To quantify in a robust manner their tropism for phagocytes, we used high-resolution flow microscopy on single cell suspensions from fish exposed for 24 h to 0.05% fluorescent NPs. This was performed on gills, which are not only easy to dissociate, but also represent an organ of high significance for host-pathogen interactions, offering a wide area of contact with the environment (39). In these experiments, specific labeling of neutrophils and macrophages was achieved using *mpx:eGFP* and *mpeg1:mCherry* transgenic fish, respectively, while DCs and IgZ⁺ cells were identified, based on previous histological results (Figure 2), as cells with strong granular and intracellular PNA staining, and cells with strong IgZ signal, respectively.

Phagocytes represented over 25% of all NP-positive cells, although they constitute less than 5% of total gill cells (Figure 6A). Of these, DCs were the most abundant NP-positive phagocytes (12.4% of total NP-positive cells) (Figures 6A,G). Macrophages and IgZ⁺ cells represented 9.3 and 3.8% of total NP-positive cells, respectively (Figures 6A,F,H). Moreover, we confirmed the absence of NP detection in neutrophils (Figures 6A,E). The 60-fold enrichment in DC proportion in NP-positive cells,

compared to their overall proportion among total gill cells, is especially striking. This ratio is to be compared to the fivefold enrichment for macrophages and threefold enrichment for IgZ⁺ cells. This strong uptake tendency of DCs was additionally evidenced by NPs being detected in 65% of all DCs (Figure 6B). By contrast, PLA-NPs were detected in only 13.8 and 3.7% of macrophages and IgZ⁺ cells, respectively.

Poly(lactic acid) nanoparticles were not only taken up by many DCs but also present in large amounts in these cells. Indeed, relative to the average intensity detected for all NP-positive cells, DCs and macrophages, but not IgZ⁺ cells, displayed significantly higher signal (Figure 6C). When a “spot count” analysis was applied, DCs significantly displayed the highest number of intracellular PLA-NP spots (on average 5.9 spots/cell), compared to macrophages (on average 2.1 spots/cell) and IgZ⁺ cells (on average 1.9 spots/cell) (Figure 6D).

Altogether, our results demonstrate that following mucosal administration, surfactant-free PLA-NPs are not only spontaneously internalized by epithelia but also efficiently accumulated in mucosal APCs and especially in DCs, which likely represent crucial target APCs of vaccine approaches.



DISCUSSION

An increasing body of evidence has revealed the potential of biodegradable polymeric NPs for mucosal immunization, in the medical and veterinary fields, and in particular in aquaculture, where oral, dipping, and balneation methods of administration are more convenient and less damaging than injection. Yet, designing strategies to further enhance efficacy of polymeric NPs as mucosal vaccine vehicles requires a better understanding of how they are taken up by mucosae and get distributed in the organism, an aspect that has been often overlooked in the field at the expense of functional immunization studies. Here, using 200 nm PLA-NPs as model NPs administered to adult zebrafish, we analyzed if surfactant-free polymeric NPs are efficiently naturally taken up by mucosae and to what extent they reach DCs, which in mammals are key professional APCs leading the immune response. Zebrafish were immersed for 24 h in a bath of fluorophore-loaded PLA-NPs, a simple administration mode that altogether targets mucosae in gills, gut, skin, and nasal cavities. Using an unbiased histological approach at whole-body level, combined to quantification by flow cytometry and advanced flow imaging in dissected organs, we showed that PLA-NPs crossed mucosal barriers of all analyzed mucosae and accumulated with specifically high efficiency in mucosal APCs, in particular in DCs. As surfactant-free PLA-NPs are most likely quickly covered by factors present in immersion water and biological tissues (14), the biodistribution of non-functionalized PLA-NPs that we describe here may also be indicative of the general tropism of surfactant-free polymeric NPs, functionalized or not.

Surfactant-Free PLA-NPs Efficiently Cross Mucosal Barriers

At the mucosal level, we observed a conserved pattern whereby PLA-NPs penetrated cells of the outer epithelial layer and accumulated in phagocytes of deeper layers (Figures 1 and 4). PLA-NPs were detected in pavement epithelial cells and phagocytes of gills, skin, and nose, in accordance with previous studies that examined the uptake of microspheres, bacteria, or nanoliposomes, in trout and zebrafish (40–43). PLA-NPs were also found in the epithelium and phagocytes of the nasal mucosa, which constitutes a promising site for mucosal vaccination in fish and mammals (44, 45). Furthermore, PLA-NPs swallowed during immersion (46) were very efficiently taken up by enterocytes, which displayed strong and diffuse NP signals in most gut regions, and were detected in phagocytes of the *lamina propria*, in agreement with other studies that addressed the intestinal uptake of bacteria, submicron polymeric NPs or proteins (34, 47). High amounts of PLA-NPs were also detected in supranuclear vacuoles of post-midgut specialized enterocytes. These cells were shown to take up foreign material such as proteins, gold NPs or bacteria from the gut *lumen*, and store it in supranuclear vacuoles, and were suggested to play an antigen-sampling role similar to mammalian M-cells (34, 35, 43, 47). Supporting this notion, we detected accumulations of PLA-NPs at the basal side of the specialized enterocyte epithelium (Figure 1D). Although we cannot rule out that PLA-NP sampling is directly performed in the *lumen* by phagocytes themselves, these observations confirm that highly efficient antigen uptake takes place in the post-midgut region.

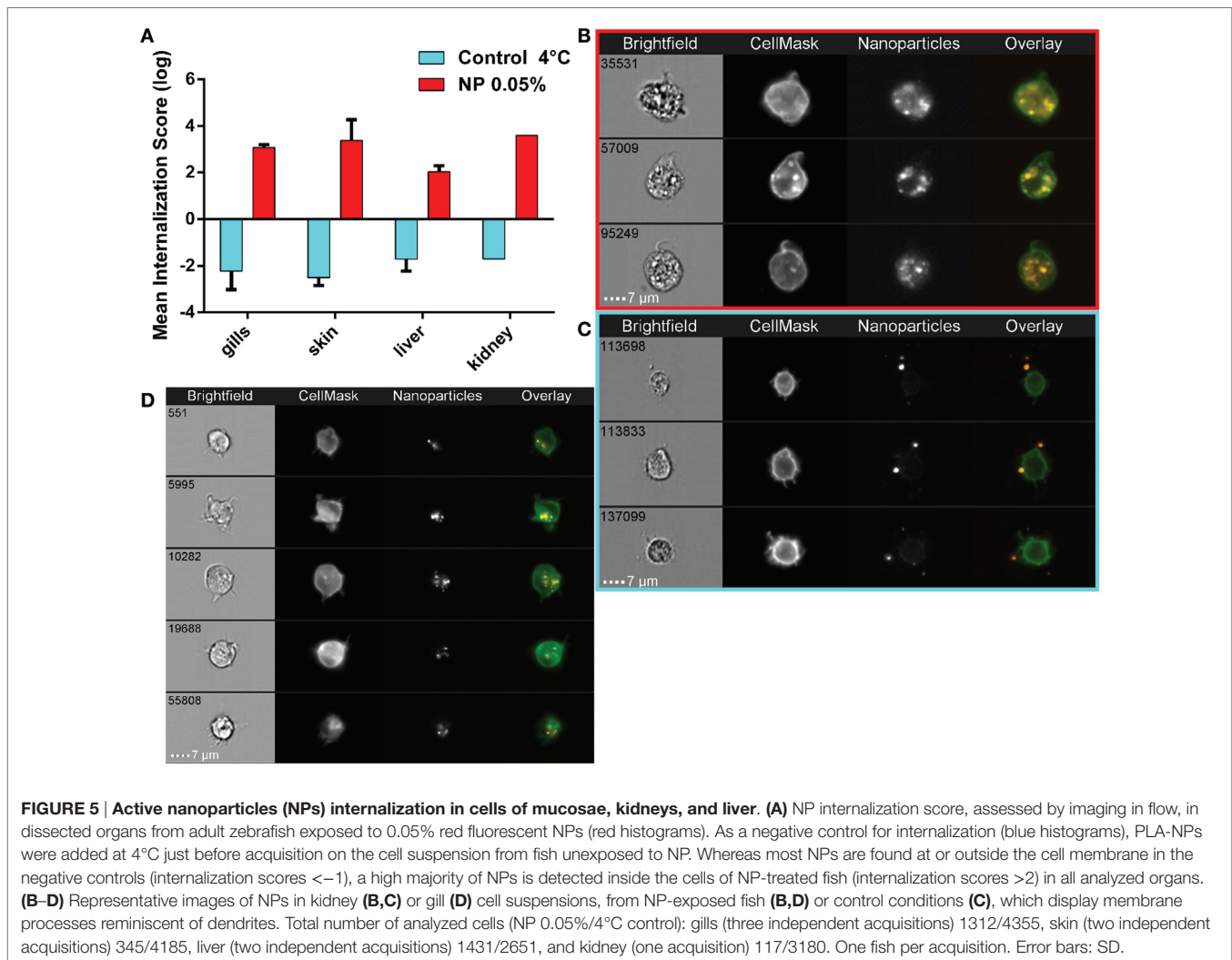


FIGURE 5 | Active nanoparticles (NPs) internalization in cells of mucosae, kidneys, and liver. (A) NP internalization score, assessed by imaging in flow, in dissected organs from adult zebrafish exposed to 0.05% red fluorescent NPs (red histograms). As a negative control for internalization (blue histograms), PLA-NPs were added at 4°C just before acquisition on the cell suspension from fish unexposed to NP. Whereas most NPs are found at or outside the cell membrane in the negative controls (internalization scores < -1), a high majority of NPs is detected inside the cells of NP-treated fish (internalization scores > 2) in all analyzed organs. **(B–D)** Representative images of NPs in kidney **(B,C)** or gill **(D)** cell suspensions, from NP-exposed fish **(B,D)** or control conditions **(C)**, which display membrane processes reminiscent of dendrites. Total number of analyzed cells (NP 0.05%/4°C control): gills (three independent acquisitions) 1312/4355, skin (two independent acquisitions) 345/4185, liver (two independent acquisitions) 1431/2651, and kidney (one acquisition) 117/3180. One fish per acquisition. Error bars: SD.

Thus, PLA-NPs efficiently cross epithelial barriers of all exposed mucosae. The fate of NPs taken up by mucosal epithelial cells and phagocytes, and the path taken by NPs from mucosal surfaces to the blood vessels remain to be investigated, to determine to what extent phagocytes contribute to this transport and if other transport mechanisms occur in mucosae.

Surfactant-Free PLA-NPs Reach a Subset of Organs with Immune-Related Functions

Being positioned in the gill cavities, the thymus, which is the primary lymphoid organ for T lymphocytes development (31), seems primarily exposed to foreign antigens. As in mucosae, PLA-NPs were detected in the outer layer of epithelial cells covering the thymus and accumulated in cells of deeper layers, suggesting an intriguing role of the thymus as antigen-sampling organ. This paradox, for an organ that plays a key role in self-nonself discrimination, deserves further study.

We furthermore demonstrated that PLA-NPs reach a subset of internal organs. The accumulation pattern of NPs in liver cells morphologically distinct from hepatocytes suggests that

these cells may be macrophages or hepatic stellate cells, which in mammals not only have the ability to engulf NPs but were also described as liver-resident professional APCs able to induce potent immune responses (37, 38, 48). The possibility that liver NP-accumulating cells may be APCs remains to be explored. We also identified by flow cytometry the presence of a small amount of PLA-NP-positive cells in kidney, which in teleosts is the main primary lymphoid organ and a site for antigen presentation and lymphocyte maturation, as well as the niche for antibody producing cells (49). Imaging flow cytometry on isolated kidney cells revealed the presence of NP-accumulating cells with processes reminiscent of dendrites, suggesting that NPs might be present in DCs in this organ. The functional importance of NP presence in thymus, liver, and kidneys for immune response remains to be further investigated. In the spleen, confocal microscopy and flow cytometry did not reveal any PLA-NP signal above the high intrinsic fluorescence. While PLGA-NPs accumulate in the spleen shortly after being administered by gavage, polystyrene beads do not (47). Moreover, *Yersinia* antigens were detected in the spleen after immersion administration, but not 125 nm

nanoliposomes (43, 50). Size difference, administration method, and NP composition may strongly influence particulate carrier uptake by the spleen.

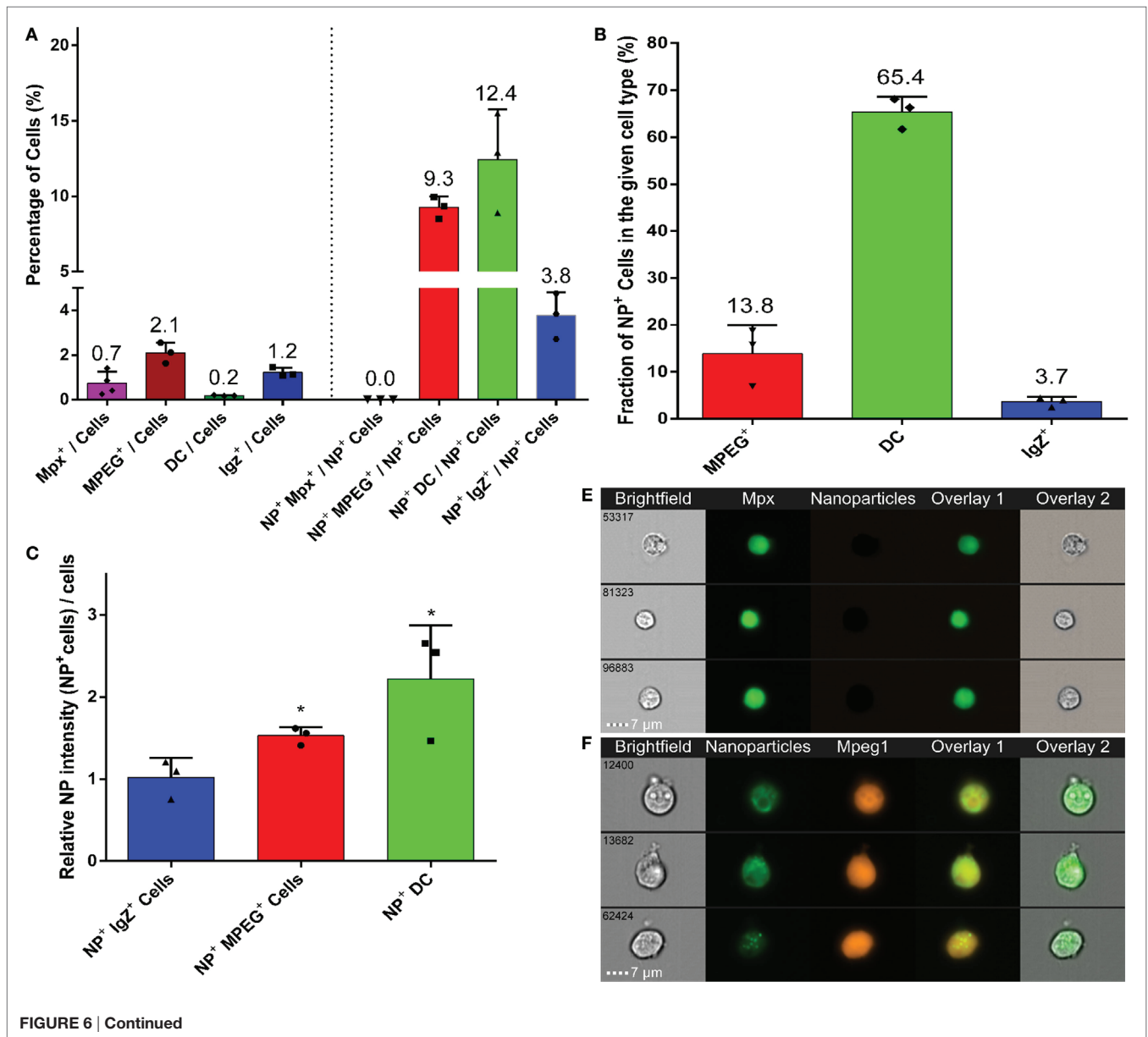
The presence of PLA-NPs in spleen and kidney raises questions regarding the path taken by NPs to reach internal organs. Although we cannot exclude that PLA-NPs diffuse through the mesenchymal tissue, their detection in gill blood vessels strongly suggests that PLA-NPs were transported to liver and kidney by the bloodstream. PLA-NPs, which have a hydrodynamic diameter too large to undergo glomerular clearance (51), may travel freely in the bloodstream or may be transported by APCs.

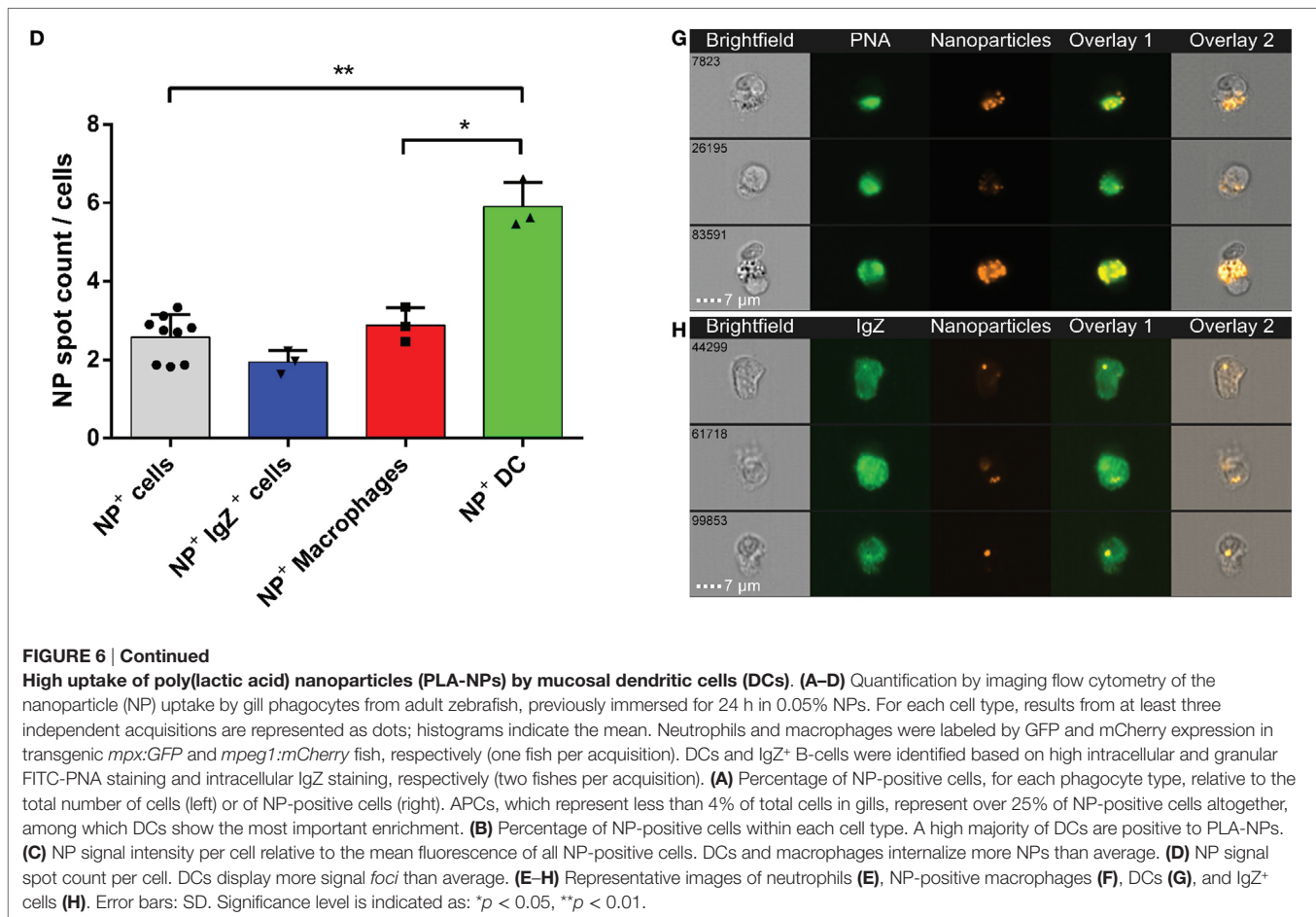
Altogether, the ability of PLA-NPs to penetrate and accumulate in all mucosae and lymphoid organs, with the exception of the spleen, is promising for fish mucosal vaccine development. Moreover, the absence of PLA-NP detection in the brain by flow cytometry suggests that PLA-NPs were not able to cross

the blood–brain barrier, reducing safety concerns for vaccine delivery.

Surfactant-Free PLA-NPs Efficiently Target DCs and Other APCs

Poly(lactic acid) nanoparticles accumulations were observed in mucosal phagocytes, corresponding to the three professional classes of APCs: macrophages, B cells, and DCs. Surprisingly, we did not observe PLA-NP uptake in zebrafish neutrophils, which contrasts with reports of PLA-NP uptake by circulating neutrophils following intravascular injections in guinea pigs or by rat granulocytes *in vitro* (52, 53). This difference may be explained by variations in NP physicochemical characteristics, such as the amount of surfactant, as polyvinyl alcohol was used for the preparation of the PLA-NPs described in these reports





(52, 53). Although we cannot exclude that PLA-NPs are taken up by neutrophils with a different kinetics than in other APCs, this hypothesis is unlikely, because fish exposure to NPs was continuous in this protocol. One may also speculate that neutrophils need to be activated (e.g., by local danger signals associated with the injection) to become able to engulf NPs, but they did not in zebrafish larvae injected with PLA-NPs (unpublished observations).

Instead, we detected NP accumulations in mucosal APCs, which, after 24 h of cumulative exposure to PLA-NPs, represented in gills 25% of all NP-positive cells. Of these NP-positive APCs, half were macrophages or B cells. The initial dogma that B cells were incapable of phagocytosis *in vivo* was broken by the finding that teleost B cells are able to engulf and kill pathogens (54). Our results showing that PLA-NPs are taken up by gill IgZ⁺ cells support the phagocytic nature of zebrafish B cells, in agreement with other studies (20, 25). The macrophages function as cleaners of the organism, performing rapid phagocytosis, and neutralization of encountered foreign materials and debris. Less potent than DCs, they are nevertheless also involved in immune response triggering. Given the great representation of macrophages and B cells in mucosae (2 and 1%, respectively, in gills), the ability of these APCs to take up PLA-NPs represents an interesting prospect for the use of particulate NPs in mucosal vaccines.

A major part of NP-positive mucosal APCs, which represented over 10% of all NP-positive cells in gills, were DCs characterized by the following features: high intracellular and granular PNA staining (in fixed/permealized tissues), dendritic-like morphology, MHC2 expression, and absence of both *Mpeg1* and *Mpx* expression. Although we cannot dismiss that all DCs might not share these characteristics, DC quantification in gills was in accordance with the macrophage/dendritic cell ratio previously described (25). In gills, where DCs represent only a small population of total cells, over 65% of DCs were positive to PLA-NPs and displayed the highest PLA-NP accumulations of all APCs, showing the great efficiency of DCs for PLA-NP uptake. Having unique ability to efficiently prime naïve T cells, mammalian DCs play a key role in orchestrating the activation and modulation of the adaptive immune response. DCs thus represent a crucial target for the development of mucosal vaccines, and the high efficiency of PLA-NP uptake by mucosal DCs, in absence of targeting molecules, makes PLA-NPs vehicles of choice for mucosal vaccine delivery.

CONCLUSION

Altogether, we show that, in absence of functionalization, surfactant-free polymeric NPs of 200 nm are able to cross mucous layers and mucosal epithelia, and to be efficiently taken

up by DCs. Thus, balneation in polymeric NPs may represent a convenient and efficient way to deliver vaccine principles to batches of adult and young fish in the aquaculture industry. Although the teleost lymphoid tissues are diffuse, zebrafish mucosae share many structural and functional similarities with mammalian mucosae, suggesting that the efficient targeting of DCs by mucosally applied polymeric NPs may be general among vertebrates, with potential applications in human health. Further work will be needed to investigate the ability of antigen-carrying polymeric NPs to induce efficient immune responses by mucosal routes. For this, functionalization strategies designed for improving the targeting *per se* of NPs toward DCs may be less beneficial for vaccine efficiency than other strategies aimed at activating DCs. Altogether, thanks to their versatility for carrying immunostimulating molecules and antigens, their biodegradability, their eco-compatibility, and, as we show here, their inherent APC targeting ability, polymeric NPs using PLA backbone, represent great prospects for the enhancement of mucosal vaccines, with potential application in human health and aquaculture.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JR participated in the conception and design of the study, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. ED and DG participated in the conception and design of the study, assisted in experiments and data analysis, and wrote the manuscript. A-LC performed histology in *fli:GFP* lines, analyzed data, and assisted in drafting the manuscript. J-PL generated *mhc2dab:eGFP* samples, assisted in designing the study, and

helped revise the manuscript. PB assisted in designing the study and helped revise the manuscript. BV assisted in the conception and design of the study, revised the manuscript, and provided reagents and lab space. All the authors read, critiqued, and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the AniRA-Cytométrie platform (T. Andrieu and S. Dussurgey), the PLATIM-Microscopie platform (C. Chamot, C. Lionnet, and E. Chatre), and the PRECI fish facility (L. Bernard and R. Renard) of SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8), the Primatiss histology platform (C. Lethias and N. El Kholi), as well as E. Aleksejeva and B. Fromy for helpful technical advice.

FUNDING

This work was supported in part by the European Commission FP7 ADITEC program (HEALTH-F4-2011-280873), the Era Net HIVERA (HIVNAOVA), and the ANR (ANR-16-CE20-0002-01), as well as by TEFOR-Investissement d'avenir (ANR-II-INBS-0014).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00190/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:592–605. doi:10.1038/nri3251
- Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* (2012) 30:142–54. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.003
- Irvine DJ, Hanson MC, Rakhra K, Tokatlian T. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy. *Chem Rev* (2015) 115:11109–46. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109
- Munang'andu HM, Mutoloki S, Evensen Ø. An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. *Front Immunol* (2015) 6:542. doi:10.3389/fimmu.2015.00542
- Pavot V, Berthet M, Rességuier J, Legaz S, Handké N, Gilbert SC, et al. Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond)* (2014) 9:2703–18. doi:10.2217/nnm.14.156
- Sharma R, Agrawal U, Mody N, Vyas SP. Polymer nanotechnology based approaches in mucosal vaccine delivery: challenges and opportunities. *Biotechnol Adv* (2015) 33:64–79. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.004
- Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* (2016) 107:163–75. doi:10.1016/j.addr.2016.06.018
- Gutjahr A, Phelip C, Coolen A-L, Monge C, Boisgard A-S, Paul S, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles-based vaccine adjuvants for lymph nodes targeting. *Vaccines (Basel)* (2016) 4:34. doi:10.3390/vaccines4040034
- Ji J, Torrealba D, Ruyra Á, Roher N. Nanodelivery systems as new tools for immunostimulant or vaccine administration: targeting the fish immune system. *Biology (Basel)* (2015) 4:664–96. doi:10.3390/biology4040664
- Primard C, Rochereau N, Luciani E, Genin C, Delair T, Paul S, et al. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* (2010) 31:6060–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.021
- Pavot V, Climent N, Rochereau N, Garcia F, Genin C, Tiraby G, et al. Directing vaccine immune responses to mucosa by nanosized particulate carriers encapsulating NOD ligands. *Biomaterials* (2016) 75:327–39. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.034
- Dubey S, Avadhani K, Mutalik S, Sivadasan S, Maiti B, Paul J, et al. *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA nanoparticle oral vaccine shows a dose-dependent protective immunity in rohu (*Labeo rohita*). *Vaccines (Basel)* (2016) 4:21. doi:10.3390/vaccines4020021
- Grabowski N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pallardy M, Kerdine-Römer S, et al. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm* (2015) 482:75–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.042
- Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted? *Chem Soc Rev* (2015) 44:6094–121. doi:10.1039/c5cs00217f
- Stachura DL, Traver D. Chapter 2 – Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods Cell Biol* (2016) 133:11–53. doi:10.1016/bs.mcb.2016.03.022
- Levrard J-P, Palha N, Langevin C, Boudinot P. Through the looking glass: witnessing host-virus interplay in zebrafish. *Trends Microbiol* (2014) 22:490–7. doi:10.1016/j.tim.2014.04.014
- Palha N, Guivel-Benhassine F, Briolat V, Lutfalla G, Sourisseau M, Ellett F, et al. Real-time whole-body visualization of chikungunya virus infection and host interferon response in zebrafish. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003619. doi:10.1371/journal.ppat.1003619
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med (Praha)* (2011) 56:2011–486.

19. Parra D, Reyes-Lopez FE, Tort L. Mucosal immunity and B cells in teleosts: effect of vaccination and stress. *Front Immunol* (2015) 6:354. doi:10.3389/fimmu.2015.00354
20. Page DM, Wittamer V, Bertrand JY, Lewis KL, Pratt DN, Delgado N, et al. An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood* (2013) 122:e1–11. doi:10.1182/blood-2012-12-471029
21. Salinas I, Zhang Y-A, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol* (2011) 35:1346–65. doi:10.1016/j.dci.2011.11.009
22. Lewis KL, Del Cid N, Traver D. Perspectives on antigen presenting cells in zebrafish. *Dev Comp Immunol* (2014) 46:63–73. doi:10.1016/j.dci.2014.03.010
23. Sunyer JO. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol* (2013) 14:320–6. doi:10.1038/ni.2549
24. Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MBF, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:15850–5. doi:10.1073/pnas.1000494107
25. Wittamer V, Bertrand JY, Gutschow PW, Traver D. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood* (2011) 117:7126–35. doi:10.1182/blood-2010-11-321448
26. Shao T, Zhu LY, Nie L, Shi W, Dong WR, Xiang LX, et al. Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells. *Dev Comp Immunol* (2015) 49(1):38–43. doi:10.1016/j.dci.2014.11.010
27. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles M-H, Kalyanaraman VS, Delair T, et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J Control Release* (2006) 115:57–67. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.006
28. Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* (2011) 117:e49–56. doi:10.1182/blood-2010-10-314120
29. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* (2006) 108:3976–8. doi:10.1182/blood-2006-05-024075
30. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* (2002) 248:307–18. doi:10.1006/dbio.2002.0711
31. Bowden TJ, Cook P, Rombout JH. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol* (2005) 19:413–27. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.003
32. Xu Z, Parra D, Gómez D, Salinas I, Zhang Y-A, von Gersdorff Jørgensen L, et al. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:13097–102. doi:10.1073/pnas.1304319110
33. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev* (2005) 122:157–73. doi:10.1016/j.mod.2004.10.009
34. Rombout JH, Lamers CH, Helfrich MH, Dekker A, Taverne-Thiele JJ. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Tissue Res* (1985) 239:519–30.
35. Fuglem B, Jirillo E, Bjerkås I, Kiyono H, Nochi T, Yuki Y, et al. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev Comp Immunol* (2010) 34:768–74. doi:10.1016/j.dci.2010.02.007
36. Xu Z, Takizawa F, Parra D, Gómez D, von Gersdorff Jørgensen L, LaPatra SE, et al. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nat Commun* (2016) 7:10728. doi:10.1038/ncomms10728
37. Zhang Z, Wang C, Zha Y, Hu W, Gao Z, Zang Y, et al. Corona-directed nucleic acid delivery into hepatic stellate cells for liver fibrosis therapy. *ACS Nano* (2015) 9:2405–19. doi:10.1021/nn505166x
38. Duong HTT, Dong Z, Su L, Boyer C, George J, Davis TP, et al. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension. *Small* (2015) 11:2291–304. doi:10.1002/smll.201402870
39. Austbø L, Aas IB, König M, Weli SC, Syed M, Falk K, et al. Transcriptional response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon challenged with infectious salmon anaemia virus. *Dev Comp Immunol* (2014) 45:107–14. doi:10.1016/j.dci.2014.02.007
40. Moore JD, Ototake M, Nakanishi T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol* (1998) 8:393–408. doi:10.1006/fsim.1998.0143
41. Zapata AG, Torroba M, Alvarez F, Anderson DP, Dixon OW, Wisniewski M. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J Fish Biol* (1987) 31:209–17. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05315.x
42. Khimmakthong U, Deshmukh S, Chettri JK, Bojesen AM, Kania PW, Dalsgaard I, et al. Tissue specific uptake of inactivated and live *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): visualization by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Microb Pathog* (2013) 59:33–41. doi:10.1016/j.micpath.2013.03.001
43. Korb R, Mehrdana F, Kania PW, Larsen MH, Frees D, Dalsgaard I, et al. Antigen uptake during different life stages of zebrafish (*Danio rerio*) using a GFP-tagged *Yersinia ruckeri*. *PLoS One* (2016) 11:e0158968. doi:10.1371/journal.pone.0158968
44. Phua KK, Staats HF, Leong KW, Nair SK. Intranasal mRNA nanoparticle vaccination induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Sci Rep* (2014) 4:5128. doi:10.1038/srep05128
45. LaPatra S, Kao S, Erhardt EB, Salinas I. Evaluation of dual nasal delivery of infectious hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* (2015) 33:771–6. doi:10.1016/j.vaccine.2014.12.055
46. Robohm RA, Koch RA. Evidence for oral ingestion as the principal route of antigen entry in bath-immunized fish. *Fish Shellfish Immunol* (1995) 5:137–50. doi:10.1016/S1050-4648(05)80023-3
47. Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, Koppang EO, Griffiths GW, Hildahl JP. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system. *Dev Comp Immunol* (2017) 67:508–18. doi:10.1016/j.dci.2016.06.016
48. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* (2007) 26:117–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011
49. Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J Immunol* (2004) 173:7317–23. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7317
50. Ruyra A, Cano-Sarabia M, García-Valtanan P, Yero D, Gibert I, Mackenzie SA, et al. Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes. *Vaccine* (2014) 32:3955–62. doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.010
51. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)* (2008) 3:703–17. doi:10.2217/17435889.3.5.703
52. Zambaux M-F, Faivre-Fiorina B, Bonneaux F, Marchal S, Merlin J-L, Dellacherie E, et al. Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. *Biomaterials* (2000) 21:975–80. doi:10.1016/S0142-9612(99)00233-1
53. Mainardes RM, Gremião MPD, Brunetti IL, da Fonseca LM, Khalil NM. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *J Pharm Sci* (2009) 98:257–67. doi:10.1002/jps.21406
54. Li J, Barreda DR, Zhang Y-A, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* (2006) 7:1116–24. doi:10.1038/ni1389

Conflict of Interest Statement: BV is cofounder in a company developing the therapeutic use of PLA nanoparticles. The remaining authors declare no commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Rességuier, Delaune, Coolen, Levraud, Boudinot, Le Guellec and Verrier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent)*. **18**, 21–5 (2005).
2. Plotkin, S. History of vaccination. *PNAS* **111**, 12283–12287 SPECIAL (2014).
3. Moser, M. & Leo, O. Key concepts in immunology. *Vaccine* **28S**, 2–13 (2010).
4. Gutjahr, A., Tiraby, G., Perouzel, E., Verrier, B. & Paul, S. Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation. *Trends in Immunology* **37**, 716 (2016).
5. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 12 (2012).
6. Dotiwala, F. *et al.* Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat. Med.* **22**, 210–216 (2016).
7. Moss, B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* **239**, 8–26 (2011).
8. Clark, H. F., Offit, P. A., Plotkin, S. A. & Heaton, P. M. The New Pentavalent Rotavirus Vaccine Composed of Bovine (Strain WC3) -Human Rotavirus Reassortants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 577–583 (2006).
9. Minor, P. D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology* **479–480**, 379–392 (2015).
10. Provost, P. J. *et al.* An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J. Med. Virol.* **19**, 23–31 (1986).
11. Hilleman, M. R., McAleer, W. J., Buynak, E. B. & McLean, A. A. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J. Infect.* **7**, 3–8 (1983).
12. Rodrigues, C. M. C., Pinto, M. V., Sadarangani, M. & Plotkin, S. A. Whither vaccines? *J. Infect.* **74**, S2–S9 (2017).
13. Appay, V., Douek, D. C. & Price, D. A. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat. Med.* **14**, 623–628 (2008).
14. Wolff, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465–8 (1990).
15. Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 776–88 (2008).
16. Sardesai, N. Y. & Weiner, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 421–9 (2011).
17. Dalmo, R. A. DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *J. Fish Dis.* **41**, 1–9 (2018).
18. Liu, M. A. & Ulmer, J. B. in *Advances in genetics* **55**, 25–40 (2005).
19. Ferraro, B. *et al.* Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 296–302 (2011).
20. Suschak, J. J., Williams, J. A. & Schmaljohn, C. S. Advancements in DNA vaccine vectors,

Références bibliographiques

- non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum. Vaccin. Immunother.* **13**, 2837–2848 (2017).
21. Würtele, H., Little, K. C. E. & Chartrand, P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.* **10**, 1791–9 (2003).
 22. Pascolo, S. The messenger's great message for vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 153–6 (2015).
 23. Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. & Weissman, D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 261–279 (2018).
 24. Hajj, K. A. & Whitehead, K. A. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2**, 17056 (2017).
 25. Lewis, J. D. & Izaurralde, E. The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.* **247**, 461–9 (1997).
 26. Weissman, D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 265–281 (2015).
 27. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. & Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* **3**, 0004.1–0004.10 (2002).
 28. Brito, L. A. *et al.* Self-amplifying mRNA vaccines. *Adv. Genet.* **89**, 179–233 (2015).
 29. Atkins, G. J., Fleeton, M. N. & Sheahan, B. J. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e33 (2008).
 30. Rodríguez-Gascón, A., del Pozo-Rodríguez, A. & Solinís, M. Á. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 1833–43 (2014).
 31. Fleeton, M. N. *et al.* Self-Replicative RNA Vaccines Elicit Protection against Influenza A Virus, Respiratory Syncytial Virus, and a Tickborne Encephalitis Virus. *J. Infect. Dis.* **183**, 1395–1398 (2001).
 32. Geall, A. J. *et al.* Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 14604–9 (2012).
 33. Bernstein, D. I. *et al.* Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine* **28**, 484–493 (2009).
 34. Vogel, A. B. *et al.* Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol. Ther.* **26**, 446–455 (2018).
 35. Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009–17 (2006).
 36. Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, e142 (2011).

Références bibliographiques

37. Jones, K. L., Drane, D. & Gowans, E. J. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* **43**, 675–81 (2007).
38. Petsch, B. *et al.* Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat. Biotechnol.* **30**, 1210–6 (2012).
39. Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L. & Barton, G. M. Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 185–214 (2011).
40. Chen, N. *et al.* RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life* **69**, 297–304 (2017).
41. Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 12542–50 (2004).
42. Desmet, C. J. & Ishii, K. J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Publ. Gr.* **12**, (2012).
43. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
44. Züst, R. *et al.* Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137–43 (2011).
45. Hovanessian, A. G. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 351–361 (2007).
46. Granot, Y. & Peer, D. Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics-An innate immune system standpoint. *Semin. Immunol.* **34**, 68–77 (2017).
47. De Beuckelaer, A., Grooten, J. & De Koker, S. Type I Interferons Modulate CD8 + T Cell Immunity to mRNA Vaccines. *Trends Mol. Med.* **23**, 216–226 (2017).
48. Brito, L. A. *et al.* A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol. Ther.* **22**, 2118–29 (2014).
49. Van Lint, S. *et al.* The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 235–251 (2015).
50. Bialkowski, L. *et al.* Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours. *Sci. Rep.* **6**, 22509 (2016).
51. Guardo, A. C. *et al.* Preclinical evaluation of an mRNA HIV vaccine combining rationally selected antigenic sequences and adjuvant signals (HTI-TriMix). *AIDS* **31**, 1 (2016).
52. Kallen, K.-J. *et al.* A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNAActive(®) vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 2263–76 (2013).

Références bibliographiques

53. Heidenreich, R. *et al.* A novel RNA-based adjuvant combines strong immunostimulatory capacities with a favorable safety profile. *Int. J. Cancer* **137**, 372–384 (2015).
54. Sebastian, M. *et al.* Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **14**, 748 (2014).
55. Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 759–780 (2014).
56. Venkatesan, S., Gershowitz, A. & Moss, B. Modification of the 5' end of mRNA. Association of RNA triphosphatase with the RNA guanylyltransferase-RNA (guanine-7-)methyltransferase complex from vaccinia virus. *J. Biol. Chem.* **255**, 903–8 (1980).
57. Pasquinelli, A. E., Dahlberg, J. E. & Lund, E. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA* **1**, 957–67 (1995).
58. Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA* **7**, 1486–95 (2001).
59. Grudzien, E., Kalek, M., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs. *J. Biol. Chem.* **281**, 1857–67 (2006).
60. Zohra, F. T., Chowdhury, E. H., Tada, S., Hoshiba, T. & Akaike, T. Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 373–378 (2007).
61. Rydzik, A. M. *et al.* Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety—fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1699–1710 (2012).
62. Bird, J. G. *et al.* The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA. *Nature* **535**, 444–7 (2016).
63. Lundstrom, K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Futur. Sci. OA* **4**, FSO300 (2018).
64. Barrett, L. W., Fletcher, S. & Wilton, S. D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 3613–3634 (2012).
65. Malone, R. W., Felgner, P. L. & Verma, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6077–81 (1989).
66. Wang, Z., Day, N., Trifillis, P. & Kiledjian, M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4552–60 (1999).

Références bibliographiques

67. Kreiter, S. *et al.* Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. *J. Immunol.* **180**, 309–18 (2008).
68. Kreiter, S. *et al.* Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. *Cancer Res.* **70**, 9031–40 (2010).
69. Gallie, D. R., Tanguay, R. L. & Leathers, V. *The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation.* *Gene* **165**, (1995).
70. Karikó, K., Muramatsu, H., Keller, J. M. & Weissman, D. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Mol. Ther.* **20**, 948–53 (2012).
71. Vivinus, S. *et al.* 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 (2001).
72. Chen, C.-Y. A. & Shyu, A.-B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465–470 (1995).
73. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–92 (1986).
74. Liu, Q. Comparative analysis of base biases around the stop codons in six eukaryotes. *Biosystems* **81**, 281–289 (2005).
75. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**, 165–75 (2005).
76. Huang, H. *et al.* Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat. Cell Biol.* **20**, 285–295 (2018).
77. Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* **16**, 1833–40 (2008).
78. Anderson, B. R. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5884–92 (2010).
79. Thess, A. *et al.* Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol. Ther.* **23**, 1456–64 (2015).
80. Kauffman, K. J. *et al.* Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles in vivo. *Biomaterials* **109**, 78–87 (2016).
81. Meyer, M. *et al.* Modified mRNA-Based Vaccines Elicit Robust Immune Responses and Protect Guinea Pigs From Ebola Virus Disease. *J. Infect. Dis.* **217**, 451–455 (2018).
82. Richner, J. M. *et al.* Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* **168**,

Références bibliographiques

- 1114–1125.e10 (2017).
83. Romani, B., Kavyanifard, A. & Allahbakhshi, E. Antibody production by in vivo RNA transfection. *Sci. Rep.* **7**, 10863 (2017).
 84. Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108–16 (1991).
 85. Mockey, M. *et al.* mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1062–1068 (2006).
 86. Uchida, S. *et al.* Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination. *Biomaterials* **150**, 162–170 (2018).
 87. Michel, Y. M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K. M. & Borman, A. M. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32268–76 (2000).
 88. Borman, A. M., Michel, Y. M., Malnou, C. E. & Kean, K. M. Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 36818–24 (2002).
 89. McNamara, M. A., Nair, S. K. & Holl, E. K. RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1–9 (2015).
 90. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–62 (1973).
 91. Shortman, K. & Heath, W. R. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* **234**, 18–31 (2010).
 92. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
 93. Schreiber, G. *et al.* Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1573–1582 (2010).
 94. O’Keeffe, M., Mok, W. H. & Radford, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4309–4325 (2015).
 95. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* **34**, 440–445 (2013).
 96. Ginhoux, F. & Merad, M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol. Cell Biol.*

Références bibliographiques

- 88**, 387–392 (2010).
97. Doebel, T., Voisin, B. & Nagao, K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol.* **38**, 817–828 (2017).
 98. Otsuka, M., Egawa, G. & Kabashima, K. Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis. *Front. Immunol.* **9**, 1768 (2018).
 99. Aguzzi, A., Kranich, J. & Krautler, N. J. Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* **35**, 105–113 (2014).
 100. Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419–426 (2007).
 101. Benteyn, D., Heirman, C., Bonehill, A., Thielemans, K. & Breckpot, K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 161–176 (2015).
 102. Jang, M. H. *et al.* CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* **176**, 803–10 (2006).
 103. Randolph, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.* **13**, 267–274 (2001).
 104. Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C. & MacPherson, G. G. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol.* **161**, 1313–9 (1998).
 105. Fernandez, N. C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **5**, 405–411 (1999).
 106. Mercer, J. & Greber, U. F. Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends Microbiol.* **21**, 380–8 (2013).
 107. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
 108. Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12889–12894 (2003).
 109. Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P. A. & Kurts, C. Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in CD4 and CD8 T Cell Activation. *Science (80-.)*. **316**, 612–616 (2007).
 110. Pelkmans, L. & Helenius, A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* **3**, 311–20 (2002).
 111. Douglas, K. L., Piccirillo, C. A. & Tabrizian, M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 676–687 (2008).

Références bibliographiques

112. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–57 (2009).
113. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *Pharmacol. Rev.* **58**, 32–45 (2006).
114. Rejman, J., Bragonzi, A. & Conese, M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.* **12**, 468–474 (2005).
115. Gabrielson, N. P. & Pack, D. W. Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J. Control. Release* **136**, 54–61 (2009).
116. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569 (2012).
117. Amigorena, S. Dendritic cell maturation and cross-presentation : timing matters ! 97–108 (2016).
118. Pollard, C., De Koker, S., Saelens, X., Vanham, G. & Grooten, J. Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines. *Trends Mol. Med.* **19**, 705–13 (2013).
119. Rinaldo, C. R. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J. Intern. Med.* **265**, 138–58 (2009).
120. W. Schott, J., Galla, M., Godinho, T., Baum, C. & Schambach, A. Viral and Non-Viral Approaches for Transient Delivery of mRNA and Proteins. *Curr. Gene Ther.* **11**, 382–398 (2011).
121. Bitzer, M., Armeanu, S., Lauer, U. M. & Neubert, W. J. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* **5**, 543–553 (2003).
122. Agapov, E. V *et al.* Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12989–94 (1998).
123. Nayak, S. & Herzog, R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther.* **17**, 295–304 (2010).
124. Selmi, A. *et al.* Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 1075–1083 (2016).
125. Granstein, R. D., Ding, W. & Ozawa, H. Induction of Anti-Tumor Immunity with Epidermal Cells Pulsed with Tumor-Derived RNA or Intradermal Administration of RNA. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 632–636 (2000).
126. Sahin, U. *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222–226 (2017).
127. Weide, B. *et al.* Results of the First Phase I/II Clinical Vaccination Trial With Direct Injection of mRNA. *J. Immunother.* **31**, 180–188 (2008).

Références bibliographiques

128. Pascolo, S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). *Handb. Exp. Pharmacol.* 221–35 (2008). doi:10.1007/978-3-540-72167-3_11
129. Qiu, P., Ziegelhoffer, P., Sun, J. & Yang, N. S. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther.* **3**, 262–8 (1996).
130. Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. & McCabe, D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9568–72 (1990).
131. Steitz, J., Britten, C. M., Wölfel, T. & Tüting, T. Effective induction of anti-melanoma immunity following genetic vaccination with synthetic mRNA coding for the fusion protein EGFP.TRP2. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 246–253 (2006).
132. Aberle, J. H., Aberle, S. W., Kofler, R. M. & Mandl, C. W. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* **79**, 15107–13 (2005).
133. Kofler, R. M. *et al.* Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1951–6 (2004).
134. Mandl, C. W. *et al.* In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat. Med.* **4**, 1438–1440 (1998).
135. Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* **177**, 437–447 (2003).
136. Johansson, D. X., Ljungberg, K., Kakoulidou, M. & Liljeström, P. Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. *PLoS One* **7**, e29732 (2012).
137. Piggott, J. M., Sheahan, B. J., Soden, D. M., O’Sullivan, G. C. & Atkins, G. J. Electroporation of RNA stimulates immunity to an encoded reporter gene in mice. *Mol. Med. Rep.* **2**, 753–6 (2009).
138. Broderick, K. E. & Humeau, L. M. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 195–204 (2015).
139. Murata-Hori, M. & Wang, Y.-L. in *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons, Ltd, 2005). doi:10.1038/npg.els.0002696
140. Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. G. & Jung, G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1–7 (2000).
141. Scheel, B. *et al.* Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1557–1566 (2005).
142. Fotin-Mleczek, M. *et al.* Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity. *J. Immunother.* **34**, 1–15 (2011).

Références bibliographiques

143. Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M. & Kallen, K.-J. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* **9**, 1319–30 (2012).
144. Rauch, S., Lutz, J., Kowalczyk, A., Schlake, T. & Heidenreich, R. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1499**, 89–107 (2017).
145. Kübler, H. *et al.* Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J. Immunother. Cancer* **3**, 26 (2015).
146. Schnee, M. *et al.* An mRNA Vaccine Encoding Rabies Virus Glycoprotein Induces Protection against Lethal Infection in Mice and Correlates of Protection in Adult and Newborn Pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004746 (2016).
147. Alberer, M. *et al.* Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet* **390**, 1511–1520 (2017).
148. Bettinger, T., Carlisle, R. C., Read, M. L., Ogris, M. & Seymour, L. W. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3882–91 (2001).
149. Udhayakumar, V. K. *et al.* Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1601412 (2017).
150. Schach, D. K. *et al.* Reversible Activation of a Cell-Penetrating Peptide in a Membrane Environment. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 12199–12202 (2015).
151. McCarthy, H. O. *et al.* Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-inspired amphipathic peptide for gene delivery. *J. Control. Release* **189**, 141–149 (2014).
152. Bennett, R. *et al.* RALA-mediated delivery of FKBPL nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine (Lond)*. **10**, 2989–3001 (2015).
153. Dehong, L., Richard, B., Kim, M., Conry, R. M. & Curiel, D. T. Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors. *Cancer Gene Ther.* **1**, 245–52 (1994).
154. Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. & Gilboa, E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 465–72 (1996).
155. Zohra, F. T., Chowdhury, E. H. & Akaike, T. High performance mRNA transfection through carbonate apatite–cationic liposome conjugates. *Biomaterials* **30**, 4006–4013 (2009).
156. Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J. O. & Safinya, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **281**, 78–81 (1998).
157. Pollard, C. *et al.* Type I IFN Counteracts the Induction of Antigen-Specific Immune Responses

Références bibliographiques

- by Lipid-Based Delivery of mRNA Vaccines. *Mol. Ther.* **21**, 251–259 (2013).
158. Kranz, L. M. *et al.* Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**, 396–401 (2016).
159. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release* **114**, 100–9 (2006).
160. Bao, Y. *et al.* Effect of PEGylation on Biodistribution and Gene Silencing of siRNA/Lipid Nanoparticle Complexes. *Pharm. Res.* **30**, 342–351 (2013).
161. Kormann, M. S. D. *et al.* Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat. Biotechnol.* **29**, 154–157 (2011).
162. Rejman, J., Tavernier, G., Bavarsad, N., Demeester, J. & De Smedt, S. C. mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *J. Control. Release* **147**, 385–391 (2010).
163. Johler, S. M., Rejman, J., Guan, S. & Rosenecker, J. Nebulisation of IVT mRNA Complexes for Intrapulmonary Administration. *PLoS One* **10**, e0137504 (2015).
164. Phua, K. K. L., Leong, K. W. & Nair, S. K. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *J. Control. Release* **166**, 227–33 (2013).
165. Pardi, N. *et al.* Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J. Control. Release* **217**, 345–351 (2015).
166. Bahl, K. *et al.* Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol. Ther.* **25**, 1316–1327 (2017).
167. Pardi, N. *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* **543**, 248–251 (2017).
168. Wang, W., Li, W., Ma, N. & Steinhoff, G. Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **14**, 46–60 (2013).
169. Tavernier, G. *et al.* mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J. Control. Release* **150**, 238–47 (2011).
170. Wu, G. Y. & Wu, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429–32 (1987).
171. Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T. & Göpferich, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 247–266 (2005).
172. Bertrand, E. *et al.* Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 12547–9 (2011).
173. Brissault, B. *et al.* Linear Topology Confers in Vivo Gene Transfer Activity to Polyethylenimines. *Bioconjug. Chem.* **17**, 759–765 (2006).

Références bibliographiques

174. Zhao, M., Li, M., Zhang, Z., Gong, T. & Sun, X. Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Deliv.* **23**, 2596–2607 (2015).
175. Debus, H., Baumhof, P., Probst, J. & Kissel, T. Delivery of messenger RNA using poly(ethylene imine)-poly(ethylene glycol)-copolymer blends for polyplex formation: biophysical characterization and in vitro transfection properties. *J. Control. Release* **148**, 334–43 (2010).
176. Démoulin, T. *et al.* Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 711–722 (2016).
177. Clamme, J. P., Azoulay, J. & Mély, Y. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **84**, 1960–8 (2003).
178. Li, M. *et al.* Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- and paracellular pathways. *J. Control. Release* **228**, 9–19 (2016).
179. Li, M. *et al.* Engineering intranasal mRNA vaccines to enhance lymph node trafficking and immune responses. *Acta Biomater.* **64**, 237–248 (2017).
180. Lisziewicz, J. *et al.* Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir. *AIDS* **19**, 35–43 (2005).
181. Midoux, P. & Monsigny, M. Efficient Gene Transfer by Histidylated Polylysine/pDNA Complexes. *Bioconjug. Chem.* **10**, 406–411 (1999).
182. Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J. & Jaffrès, P.-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–78 (2009).
183. Trimaille, T. & Verrier, B. Micelle-Based Adjuvants for Subunit Vaccine Delivery. *Vaccines* **3**, 803–13 (2015).
184. Uchida, S. *et al.* Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials* **82**, 221–228 (2016).
185. Chahal, J. S. *et al.* Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E4133-42 (2016).
186. Gutjahr, A. *et al.* Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines* **4**, (2016).
187. Phua, K. K. L., Staats, H. F., Leong, K. W. & Nair, S. K. Intranasal mRNA nanoparticle vaccination induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Sci. Rep.* **4**, 5128 (2014).

Références bibliographiques

188. Weide, B. *et al.* Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *J. Immunother.* **32**, 498–507 (2009).
189. Sebastian, M. *et al.* Messenger RNA vaccination in NSCLC: Findings from a phase I/IIa clinical trial. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2584–2584 (2011).
190. Hekele, A. *et al.* Rapidly produced SAM(®) vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg. Microbes Infect.* **2**, e52 (2013).
191. Bogers, W. M. *et al.* Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. *J. Infect. Dis.* **211**, 947–55 (2015).
192. Perche, F. *et al.* Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **7**, 445–453 (2011).
193. Richner, J. M. *et al.* Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* **170**, 273–283.e12 (2017).
194. Lazzaro, S. *et al.* CD8 T-cell priming upon mRNA vaccination is restricted to bone-marrow-derived antigen-presenting cells and may involve antigen transfer from myocytes. *Immunology* **146**, 312–326 (2015).
195. Chahal, J. S. *et al.* An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. *Sci. Rep.* **7**, 252 (2017).
196. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–18 (1994).
197. Syme, R., Bajwa, R., Robertson, L., Stewart, D. & Glück, S. Comparison of CD34 and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Mobilized Peripheral Blood from Cancer Patients. *Stem Cells* **23**, 74–81 (2005).
198. Bai, L., Feuerer, M., Beckhove, P., Umansky, V. & Schirmacher, V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. *Int. J. Oncol.* **20**, 247–53 (2002).
199. Gilboa, E. & Vieweg, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol. Rev.* **199**, 251–263 (2004).
200. Bontkes, H. J. *et al.* Dendritic cells transfected with interleukin-12 and tumor-associated antigen messenger RNA induce high avidity cytotoxic T cells. *Gene Ther.* **14**, 366–375 (2007).
201. Schuurhuis, D. H. *et al.* In situ Expression of Tumor Antigens by Messenger RNA-Electroporated Dendritic Cells in Lymph Nodes of Melanoma Patients. *Cancer Res.* **69**, 2927–

Références bibliographiques

- 2934 (2009).
202. Kyte, J. A. *et al.* Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.* **13**, 905–918 (2006).
203. Van Gulck, E. *et al.* mRNA-based dendritic cell vaccination induces potent antiviral T-cell responses in HIV-1-infected patients. *AIDS* **26**, F1–F12 (2012).
204. Routy, J.-P. *et al.* Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin. Immunol.* **134**, 140–7 (2010).
205. Allard, S. D. *et al.* A phase I/IIa immunotherapy trial of HIV-1-infected patients with Tat, Rev and Nef expressing dendritic cells followed by treatment interruption. *Clin. Immunol.* **142**, 252–268 (2012).
206. Gandhi, R. T. *et al.* Immunization of HIV-1-Infected Persons With Autologous Dendritic Cells Transfected With mRNA Encoding HIV-1 Gag and Nef: Results of a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **71**, 246–53 (2016).
207. Jacobson, J. M. *et al.* Dendritic Cell Immunotherapy for HIV-1 Infection Using Autologous HIV-1 RNA: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **72**, 31–8 (2016).
208. Gay, C. L. *et al.* Immunogenicity of AGS-004 Dendritic Cell Therapy in Patients Treated During Acute HIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **34**, 111–122 (2018).
209. Van Driessche, A. *et al.* Clinical-grade manufacturing of autologous mature mRNA-electroporated dendritic cells and safety testing in acute myeloid leukemia patients in a phase I dose-escalation clinical trial. *Cytotherapy* **11**, 653–668 (2009).
210. Amin, A. *et al.* Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 2 study results. *J. Immunother. cancer* **3**, 14 (2015).
211. Khoury, H. J. *et al.* Immune responses and long-term disease recurrence status after telomerase-based dendritic cell immunotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* **123**, 3061–3072 (2017).
212. Borch, T. H. *et al.* mRNA-transfected dendritic cell vaccine in combination with metronomic cyclophosphamide as treatment for patients with advanced malignant melanoma. *Oncoimmunology* **5**, e1207842 (2016).
213. Kongsted, P. *et al.* Dendritic cell vaccination in combination with docetaxel for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: A randomized phase II study. *Cytotherapy* **19**, 500–513 (2017).
214. Kyte, J. A. *et al.* Immune response and long-term clinical outcome in advanced melanoma

Références bibliographiques

- patients vaccinated with tumor-mRNA-transfected dendritic cells. *Oncoimmunology* **5**, e1232237 (2016).
215. Vik-Mo, E. O. *et al.* Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1499–509 (2013).
216. Lesterhuis, W. J. *et al.* Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* **30**, 5091–7 (2010).
217. Aarntzen, E. H. J. G. *et al.* Vaccination with mRNA-Electroporated Dendritic Cells Induces Robust Tumor Antigen-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Responses in Stage III and IV Melanoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5460–5470 (2012).
218. Bol, K. F. *et al.* Long Overall Survival After Dendritic Cell Vaccination in Metastatic Uveal Melanoma Patients. *Am. J. Ophthalmol.* **158**, 939–947.e5 (2014).
219. Bol, K. F. *et al.* Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 327–39 (2016).
220. Bol, K. F. *et al.* Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* **4**, e1019197 (2015).
221. Wilgenhof, S. *et al.* A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients. *Ann. Oncol.* **24**, 2686–2693 (2013).
222. Wilgenhof, S. *et al.* Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1330–1338 (2016).
223. Probst, J. *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* **14**, 1175–80 (2007).
224. Diken, M. *et al.* Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation. *Gene Ther.* **18**, 702–8 (2011).
225. Martínez-Gómez, J. M. *et al.* Intralymphatic Injections as a New Administration Route for Allergen-Specific Immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **150**, 59–65 (2009).
226. Van Lint, S. *et al.* Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy. *Cancer Res.* **72**, 1661–71 (2012).
227. Dewitte, H. *et al.* Theranostic mRNA-loaded microbubbles in the lymphatics of dogs: implications for drug delivery. *Theranostics* **5**, 97–109 (2015).
228. Broos, K. *et al.* Particle-mediated Intravenous Delivery of Antigen mRNA Results in Strong

Références bibliographiques

- Antigen-specific T-cell Responses Despite the Induction of Type I Interferon. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **5**, e326 (2016).
229. Neutra, M. R. & Kozlowski, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 148–58 (2006).
230. Van Nuffel, A. M. T. *et al.* Intravenous and intradermal TriMix-dendritic cell therapy results in a broad T-cell response and durable tumor response in a chemorefractory stage IV-M1c melanoma patient. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1033–1043 (2012).
231. Rausch, S., Schwentner, C., Stenzl, A. & Bedke, J. mRNA vaccine CV9103 and CV9104 for the treatment of prostate cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 3146–52 (2014).
232. Leal, L. *et al.* Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *AIDS* **1** (2018). doi:10.1097/QAD.0000000000002026
233. Midoux, P. & Pichon, C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 221–234 (2015).
234. Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzakos, A. G. & Stojanovska, L. Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. *J. Drug Deliv.* **2013**, 869718 (2013).
235. Petros, R. A. & DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 615–627 (2010).
236. Ueno, H. *et al.* Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Semin. Immunol.* **23**, 21–7 (2011).
237. Hattori, Y., Kawakami, S., Nakamura, K., Yamashita, F. & Hashida, M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 828–34 (2006).
238. Le Moignic, A. *et al.* Preclinical evaluation of mRNA trimannosylated lipopolyplexes as therapeutic cancer vaccines targeting dendritic cells. *J. Control. Release* **278**, 110–121 (2018).
239. Lu, Y., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes. *Biomaterials* **28**, 3255–3262 (2007).
240. Cintolo, J. A., Datta, J., Mathew, S. J. & Czerniecki, B. J. Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncol.* **8**, 1273–99 (2012).
241. Engering, A. *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* **168**, 2118–26 (2002).
242. Bonifaz, L. C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* **199**, 815–24 (2004).
243. Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77–84 (2002).

Références bibliographiques

244. Macri, C., Dumont, C., Johnston, A. P. & Mintern, J. D. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e66 (2016).
245. Trumpfheller, C. *et al.* Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J. Exp. Med.* **203**, 607–17 (2006).
246. Tacke, P. J. *et al.* Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* **106**, 1278–1285 (2005).
247. Lehmann, C. H. K. *et al.* Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies. *Vaccines* **4**, (2016).
248. Rosalia, R. A. *et al.* CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses. *Biomaterials* **40**, 88–97 (2015).
249. Reichmuth, A. M., Oberli, M. A., Jaklenec, A., Langer, R. & Blankschtein, D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther. Deliv.* **7**, 319–334 (2016).
250. Su, X., Fricke, J., Kavanagh, D. G. & Irvine, D. J. In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles. *Mol. Pharm.* **8**, 774–87 (2011).
251. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–69 (2004).
252. Burgdorf, S. & Kurts, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 89–95 (2008).
253. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, R1–R4 (1989).
254. Tyler, B., Gullotti, D., Mangraviti, A., Utsuki, T. & Brem, H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **107**, 163–175 (2016).
255. Pavot, V. *et al.* Poly(lactic acid) and poly(lactic- co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine* **9**, 2703–2718 (2014).
256. Primard, C. *et al.* Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* **31**, 6060–8 (2010).
257. Aline, F. *et al.* Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine* **27**, 5284–5291 (2009).
258. Ataman-Önal, Y. *et al.* Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release* **112**, 175–185 (2006).

Références bibliographiques

259. Lamalle-Bernard, D. *et al.* Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J. Control. Release* **115**, 57–67 (2006).
260. Pavot, V. *et al.* Encapsulation of Nod1 and Nod2 receptor ligands into poly(lactic acid) nanoparticles potentiates their immune properties. *J. Control. Release* **167**, 60–7 (2013).
261. Trumpfheller, C. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2574–9 (2008).
262. Johnston, D., Zaidi, B. & Bystry, J.-C. TLR7 imidazoquinoline ligand 3M-019 is a potent adjuvant for pure protein prototype vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1133–1141 (2007).
263. Rességuier, J. *et al.* Specific and Efficient Uptake of Surfactant-Free Poly(Lactic Acid) Nanovaccine Vehicles by Mucosal Dendritic Cells in Adult Zebrafish after Bath Immersion. *Front. Immunol.* **8**, 190 (2017).
264. Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 877–883 (2013).
265. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* **23**, 147–160 (2009).
266. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–71 (1983).
267. Gallo, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865–7 (1983).
268. de Goede, A. L., Vulto, A. G., Osterhaus, A. D. M. E. & Gruters, R. A. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis of HIV infection. *Ann. Pharm. Françaises* **73**, 87–99 (2015).
269. Heaphy, S. *et al.* HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685–93 (1990).
270. Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 484–496 (2015).
271. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 11–23 (2010).
272. Ruelas, D. S. & Greene, W. C. An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell* **155**, 519–529 (2013).
273. De Clercq, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of

Références bibliographiques

- HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**, 307–320 (2009).
274. García, F., León, A., Gatell, J. M., Plana, M. & Gallart, T. Therapeutic vaccines against HIV infection. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**, 569–81 (2012).
275. Fowke, K. R. *et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* **348**, 1347–1351 (1996).
276. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* **27**, 406–416 (2007).
277. Devito, C. *et al.* Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J. Immunol.* **165**, 5170–6 (2000).
278. Choi, R. Y. *et al.* Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *AIDS* **26**, 2155–63 (2012).
279. Kaul, R. *et al.* HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* **13**, 23–9 (1999).
280. Bomsel, M. *et al.* Immunization with HIV-1 gp41 Subunit Virosomes Induces Mucosal Antibodies Protecting Nonhuman Primates against Vaginal SHIV Challenges. *Immunity* **34**, 269–280 (2011).
281. Mascola, J. R. & Haynes, B. F. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunol. Rev.* **254**, 225–244 (2013).
282. Bernardin, F., Kong, D., Peddada, L., Baxter-Lowe, L. A. & Delwart, E. Human Immunodeficiency Virus Mutations during the First Month of Infection Are Preferentially Found in Known Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes. *J. Virol.* **79**, 11523–11528 (2005).
283. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
284. El-Far, M. *et al.* T-cell exhaustion in HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **5**, 13–9 (2008).
285. Bailey, J. R., Williams, T. M., Siliciano, R. F. & Blankson, J. N. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57 + elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* **203**, 1357–1369 (2006).
286. Almeida, J. R. *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**, 6351–60 (2009).
287. Hersperger, A. R., Migueles, S. A., Betts, M. R. & Connors, M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 169–73 (2011).
288. Geldmacher, C. *et al.* CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions

Références bibliographiques

- is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J. Virol.* **81**, 2440–8 (2007).
289. Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* **103**, 966–72 (2004).
290. Trecarichi, E. M. *et al.* Partial protective effect of CCR5-Delta 32 heterozygosity in a cohort of heterosexual Italian HIV-1 exposed uninfected individuals. *AIDS Res. Ther.* **3**, 22 (2006).
291. Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–725 (1996).
292. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood* **117**, 2791–9 (2011).
293. Chiu, Y.-L. & Greene, W. C. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol.* **27**, 291–297 (2006).
294. Croxford, J. L. & Gasser, S. Damage control: how HIV survives the editor APOBEC3G. *Nat. Immunol.* **12**, 925–927 (2011).
295. Ulena, N. K. *et al.* Relationship between Human Immunodeficiency Type 1 Infection and Expression of Human APOBEC3G and APOBEC3F. *J. Infect. Dis.* **198**, 486–492 (2008).
296. Johnson, W. E. & Sawyer, S. L. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* **61**, 163–176 (2009).
297. Neil, S. J. D., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425–430 (2008).
298. Kiepiela, P. *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**, 769–75 (2004).
299. Martin, M. P. *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* **39**, 733–40 (2007).
300. Ravet, S. *et al.* Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* **109**, 4296–305 (2007).
301. Haynes, B. F. New approaches to HIV vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* **35**, 39–47 (2015).
302. Ross, A. L., Bråve, A., Scarlatti, G., Manrique, A. & Buonaguro, L. Progress towards development of an HIV vaccine: report of the AIDS Vaccine 2009 Conference. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 305–316 (2010).
303. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2209–2220 (2009).
304. Stephenson, K. E., D’Couto, H. T. & Barouch, D. H. New concepts in HIV-1 vaccine

Références bibliographiques

- development. *Curr. Opin. Immunol.* **41**, 39–46 (2016).
305. Corey, L. *et al.* Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. *Sci. Transl. Med.* **7**, 310rv7 (2015).
306. Haynes, B. F. *et al.* Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1275–1286 (2012).
307. Bonsignori, M. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J. Virol.* **86**, 11521–32 (2012).
308. Barouch, D. H. *et al.* Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. *Science* **349**, 320–4 (2015).
309. Stamatatos, L. HIV vaccine design: the neutralizing antibody conundrum. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 316–323 (2012).
310. Sanders, R. W. *et al.* A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog.* **9**, e1003618 (2013).
311. Hansen, S. G. *et al.* Cytomegalovirus vectors violate CD8⁺ T cell epitope recognition paradigms. *Science* **340**, 1237874 (2013).
312. Barouch, D. H. *et al.* Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). *Lancet* **392**, 232–243 (2018).
313. Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B. & Debre, P. Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. *Science (80-.)*. **305**, 205–208 (2004).
314. Pantaleo, G. & Lévy, Y. Vaccine and immunotherapeutic interventions. *Curr. Opin. HIV AIDS* **8**, 236–242 (2013).
315. Autran, B. Toward a cure for HIV-Seeking effective therapeutic vaccine strategies. *Eur. J. Immunol.* **45**, 3215–3221 (2015).
316. de Goede, A. L., Vulto, A. G., Osterhaus, A. D. M. E. & Gruters, R. A. Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part II: Vaccination strategies for HIV. *Ann. Pharm. Françaises* **73**, 169–179 (2015).
317. Romain, G. *et al.* CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2019–2030 (2012).
318. Van Gulck, E. R. A. *et al.* Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. *Blood* **107**, 1818–1827 (2006).

Références bibliographiques

319. Climent, N. *et al.* Loading dendritic cells with PLA-p24 nanoparticles or MVA expressing HIV genes induces HIV-1-specific T cell responses. *Vaccine* **32**, 6266–6276 (2014).
320. Phua, K. K. L., Nair, S. K. & Leong, K. W. Messenger RNA (mRNA) nanoparticle tumour vaccination. *Nanoscale* **6**, 7715 (2014).
321. Ribeiro, S., Hussain, N. & Florence, A. T. Release of DNA from dendriplexes encapsulated in PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **298**, 354–360 (2005).
322. He, Q., Liu, J., Sun, X. & Zhang, Z.-R. Preparation and characteristics of DNA-nanoparticles targeting to hepatocarcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* **10**, 660–3 (2004).
323. Cullen, B. R. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 419–424 (2003).
324. Battiste, J. L. *et al.* Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science* **273**, 1547–51 (1996).
325. Gosser, Y. *et al.* Peptide-triggered conformational switch in HIV-1 RRE RNA complexes. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 146–150 (2001).
326. Kumar, S. *et al.* Specificity of RSG-1.2 Peptide Binding to RRE-IIB RNA Element of HIV-1 over Rev Peptide Is Mainly Enthalpic in Origin. *PLoS One* **6**, e23300 (2011).
327. Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D. & Frankel, A. D. RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* **73**, 1031–40 (1993).
328. Casu, F., Duggan, B. M. & Hennig, M. The Arginine-Rich RNA-Binding Motif of HIV-1 Rev Is Intrinsically Disordered and Folds upon RRE Binding. *Biophys. J.* **105**, 1004–1017 (2013).
329. Daugherty, M. D. & Frankel, A. D. A Solution to Limited Genomic Capacity: Using Adaptable Binding Surfaces to Assemble the Functional HIV Rev Oligomer on RNA. *Mol. Cell* **31**, 824–834 (2008).
330. Michael, L. A., Chenault, J. A., Miller, B. R., Knolhoff, A. M. & Nagan, M. C. Water, Shape Recognition, Salt Bridges, and Cation–Pi Interactions Differentiate Peptide Recognition of the HIV Rev-Responsive Element. *J. Mol. Biol.* **392**, 774–786 (2009).
331. Fernandes, J., Jayaraman, B. & Frankel, A. The HIV-1 Rev response element: an RNA scaffold that directs the cooperative assembly of a homo-oligomeric ribonucleoprotein complex. *RNA Biol.* **9**, 6–11 (2012).
332. 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.* **158**, 2723–30 (1997).
333. Drogoz, A. *et al.* Towards biocompatible vaccine delivery systems: interactions of colloidal PECs based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen. *Biomacromolecules* **9**, 583–91 (2008).

Références bibliographiques

334. Van Ryk, D. I. & Venkatesan, S. Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 17452–63 (1999).
335. Evans, B. C. *et al.* Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* e50166 (2013). doi:10.3791/50166
336. Minigo, G. *et al.* Poly-l-lysine-coated nanoparticles: A potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. *Vaccine* **25**, 1316–1327 (2007).
337. Hofman, J. *et al.* In Vitro Transfection Mediated by Dendrigraft Poly(L -lysines): The Effect of Structure and Molecule Size. *Macromol. Biosci.* **13**, 167–176 (2013).
338. Liu, P., Yu, H., Sun, Y., Zhu, M. & Duan, Y. A mPEG-PLGA-b-PLL copolymer carrier for adriamycin and siRNA delivery. *Biomaterials* **33**, 4403–4412 (2012).
339. Langlet-Bertin, B. *et al.* Design and Evaluation of Histidine-Rich Amphipathic Peptides for siRNA Delivery. *Pharm. Res.* **27**, 1426–1436 (2010).
340. Wolf, J. *et al.* pH-Dependent Membrane Interactions of the Histidine-Rich Cell-Penetrating Peptide LAH4-L1. *Biophys. J.* **113**, 1290–1300 (2017).
341. Peek, L. J., Middaugh, C. R. & Berkland, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 915–28 (2008).
342. Kastenmüller, W., Kastenmüller, K., Kurts, C. & Seder, R. A. Dendritic cell-targeted vaccines — hope or hype? *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 705–711 (2014).
343. Geall, A. J., Mandl, C. W. & Ulmer, J. B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin. Immunol.* **25**, 152–9 (2013).
344. Islam, M. A. *et al.* Biomaterials for mRNA Delivery. doi:10.1039/c5bm00198f
345. Gutjahr, A. *et al.* Cutting Edge: A Dual TLR2 and TLR7 Ligand Induces Highly Potent Humoral and Cell-Mediated Immune Responses. *J. Immunol.* **198**, 4205–4209 (2017).
346. Ruiz, S. *et al.* A novel CD4-CD8 α +CD205+CD11b- murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis. *Cell. Microbiol.* **7**, 1659–71 (2005).
347. White, R. M. *et al.* Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* **2**, 183–189 (2008).
348. Fisher, K. J. & Wilson, J. M. *The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer.* *Biochem. J* **321**, (1997).
349. Wolfert, M. & Seymour, L. Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. *Gene Ther.* **5**, 409–414 (1998).
350. Scheicher, B., Schachner-Nedherer, A.-L. & Zimmer, A. Protamine–oligonucleotide-

Références bibliographiques

- nanoparticles: Recent advances in drug delivery and drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **75**, 54–59 (2015).
351. Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A. & Uslu, B. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunct. Syst. Comb. Deliv. Biosensing Diagnostics* 67–108 (2017). doi:10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8
352. de Figueiredo, I. R., Freire, J. M., Flores, L., Veiga, A. S. & Castanho, M. A. R. B. Cell-penetrating peptides: A tool for effective delivery in gene-targeted therapies. *IUBMB Life* **66**, 182–194 (2014).
353. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **17**, 850–860 (2012).
354. Lehto, T., Kurrikoff, K. & Langel, Ü. Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 823–836 (2012).
355. Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O. & Bechinger, B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1564–8 (2003).
356. Farrotti, A. *et al.* Molecular dynamics methods to predict peptide locations in membranes: LAH4 as a stringent test case. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 581–592 (2015).
357. Perrone, B., Miles, A. J., Salnikow, E. S., Wallace, B. A. & Bechinger, B. Lipid interactions of LAH4, a peptide with antimicrobial and nucleic acid transfection activities. *Eur. Biophys. J.* **43**, 499–507 (2014).
358. Jain, A. K. *et al.* Development of polymeric–cationic peptide composite nanoparticles, a nanoparticle-in-nanoparticle system for controlled gene delivery. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 7183 (2015).
359. Lam, J. K. W. *et al.* Effective endogenous gene silencing mediated by pH responsive peptides proceeds via multiple pathways. *J. Control. Release* **158**, 293–303 (2012).
360. Mason, A. J. *et al.* Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J. Control. Release* **118**, 95–104 (2007).
361. Kallen, K.-J. & Theß, A. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. *Ther. Adv. vaccines* **2**, 10–31 (2014).
362. Lutz, J. *et al.* Unmodified mRNA in LNPs constitutes a competitive technology for prophylactic vaccines. *npj Vaccines* **2**, 29 (2017).
363. Lou, B., De Koker, S., Lau, C. Y. J., Hennink, W. E. & Mastrobattista, E. mRNA polyplexes with post-conjugated GALA peptides efficiently target, transfect and activate antigen

Références bibliographiques

- presenting cells. *Bioconjug. Chem.* (2018). doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00524
364. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* **8**, 543–557 (2009).
365. Farkhani, S. M. *et al.* Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* **57**, 78–94 (2014).
366. Bell, G. D., Yang, Y., Leung, E. & Krissansen, G. W. mRNA transfection by a Xentry-protamine cell-penetrating peptide is enhanced by TLR antagonist E6446. *PLoS One* **13**, e0201464 (2018).
367. Li, S., Rizzo, M. A., Bhattacharya, S. & Huang, L. Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Ther.* **5**, 930–7 (1998).
368. Joshi, V. B., Geary, S. M. & Salem, A. K. Biodegradable particles as vaccine antigen delivery systems for stimulating cellular immune responses. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 2584–90 (2013).
369. Mahapatro, A. & Singh, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology* **9**, 55 (2011).
370. Legaz, S. *et al.* Evaluation of polylactic acid nanoparticles safety using *Drosophila* model. *Nanotoxicology* **10**, 1136–1143 (2016).
371. Pérez-Ortín, J. E., Alepuz, P., Chávez, S. & Choder, M. Eukaryotic mRNA Decay: Methodologies, Pathways, and Links to Other Stages of Gene Expression. *J. Mol. Biol.* **425**, 3750–3775 (2013).
372. Persano, S. *et al.* Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. *Biomaterials* **125**, 81–89 (2017).
373. Manolova, V. *et al.* Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1404–13 (2008).
374. Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 787–96 (2010).
375. Leal, L. *et al.* New challenges in therapeutic vaccines against HIV infection. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 587–600 (2017).
376. Wang, L. H., Rothberg, K. G. & Anderson, R. G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**, 1107–17 (1993).
377. Macia, E. *et al.* Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839–850 (2006).
378. Idilli, A. I. *et al.* Microtubule Depolymerization Affects Endocytosis and Exocytosis in the Tip and Influences Endosome Movement in Tobacco Pollen Tubes. *Mol. Plant* **6**, 1109–1130

Références bibliographiques

- (2013).
379. Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 836–843 (2011).
380. Key, K. A., Oakley, A. C. & Pizzo, S. V. Effects of pimozide and penfluridol on the binding and endocytosis of alpha 2-macroglobulin-CH₃NH₂ by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3712–4 (1984).
381. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deléage, G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147–50 (2000).
382. Probst, J. *et al.* Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. (2006). doi:10.1186/1479-0556-4-4
383. Wittamer, V., Bertrand, J. Y., Gutschow, P. W. & Traver, D. Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood* **117**, 7126–35 (2011).
384. Bell, N. M. & Lever, A. M. L. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* **21**, 136–144 (2013).
385. Verrier, B. *et al.* Exploiting Natural Cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 p17 Protein and Anti-gp41 2F5 Antibody to Induce HIV-1 Neutralizing Responses In Vivo. *Front. Immunol.* **8**, 770 (2017).
386. Knudsen, N. P. H. *et al.* Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci. Rep.* **6**, 19570 (2016).
387. Xu, Y. *et al.* Incorporation of a Nuclear Localization Signal in pH Responsive LAH4-L1 Peptide Enhances Transfection and Nuclear Uptake of Plasmid DNA. *Mol. Pharm.* **13**, 3141–3152 (2016).
388. Jayaraman, M. *et al.* Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 8529–8533 (2012).
389. Prongidi-Fix, L. *et al.* Self-Promoted Cellular Uptake of Peptide/DNA Transfection Complexes. *Biochemistry* **46**, 11253–11262 (2007).
390. Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **219**, 143–156 (2007).
391. Verma, A. & Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* **6**, 12–21 (2010).
392. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. **6**, 715 (2011).
393. De Koker, S. *et al.* Designing polymeric particles for antigen delivery. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 320–39 (2011).

Références bibliographiques

394. Martinez-Picado, J. *et al.* Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **80**, 3617–3623 (2006).