

Titre: Développement de complexes polyélectrolytes à base d'acide
Title: hyaluronique et de chitosane pour la livraison d'ARN messager

Auteur: Ousamah Younoss Soliman
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Soliman, O. Y. (2018). Développement de complexes polyélectrolytes à base
Citation: d'acide hyaluronique et de chitosane pour la livraison d'ARN messager [Mémoire
de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/3121/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3121/>
PolyPublie URL:

Directeurs de
recherche: Gregory De Crescenzo, Michael D. Buschmann, & Marc Lavertu
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE COMPLEXES POLYÉLECTROLYTES À BASE D'ACIDE
HYALURONIQUE ET DE CHITOSANE POUR LA LIVRAISON D'ARN MESSAGER

OUSAMAH YOUNOSS SOLIMAN
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

MAI 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉVELOPPEMENT DE COMPLEXES POLYÉLECTROLYTES À BASE D'ACIDE
HYALURONIQUE ET DE CHITOSANE POUR LA LIVRAISON D'ARN MESSAGER

présenté par : SOLIMAN Ousamah Younoss

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

Mme LEBLOND CHAIN Jeanne, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À ma mère, mon père, ma sœur et mes frères

Ce mémoire n'aurait pas lieu sans vous.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche initial, le Professeur Michael Buschmann, qui m'a permis de faire une maîtrise au sein de son groupe de recherche, merci de m'avoir offert cette opportunité. Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, Dr. Marc Lavertu pour m'avoir donné de son temps et son expertise durant ma maîtrise. J'apprécie tes encouragements soutenus, tes conseils pour les plans d'expériences et ton optimisme face à tous les défis qui se sont présentés. Je voudrais aussi remercier le Professeur Gregory De Crescenzo, qui m'a permis de rester inscrit dans le programme durant cette période de transition du groupe. Un grand merci à Dr. Mohamad-Gabriel Alameh pour son énorme soutien durant les périodes les plus difficiles de cette épreuve, sans qui j'aurais eu beaucoup de mal à finir. J'ai appris beaucoup de toi et j'apprécie énormément ta patience, tes encouragements et ton transfert de connaissances en biologie moléculaire. Je tiens à remercier Ashkan Tavakoli, pour m'avoir supervisé et conseillé durant mes débuts dans ce groupe de recherche, tu as le don d'amener une ambiance agréable à l'environnement de travail. Finalement, je tiens à remercier Martine Bail et Étienne Jeandupeux pour leur aide durant les expériences en laboratoire.

RÉSUMÉ

Parmi les différents types de nanoparticules développés pour la livraison d'acides nucléiques, les complexes de polyélectrolytes (PEC), sont populaires en raison de leur facilité de production. Le chitosane (CS) est l'un des polycations les plus étudiés pour la livraison de matériel génétique thérapeutique dû à ses propriétés bénéfiques reconnues (biocompatibilité, biodégradabilité, absence de toxicité). Lorsqu'il est mélangé avec l'acide nucléique, il y a une formation spontanée de PEC via un processus principalement entraîné par de fortes attractions électrostatiques et un gain d'entropie associé à la libération de contre-ions. L'ajout d'acide hyaluronique (HA) aux nanoparticules CS/ARNm est une approche prometteuse pour la livraison d'ARNm, en raison du potentiel de combiner la capacité tampon du chitosane (effet éponge protonique) avec l'hémocompatibilité améliorée fournie par l'HA négativement chargée et l'internalisation médiée par récepteur de l'acide hyaluronique, ce qui pourrait conduire à l'administration ciblée de nombreuses tumeurs qui régulent positivement l'expression des récepteurs HA tels que CD44 et RHAMM. Contrairement à d'autres glycosaminoglycanes (GAG), l'HA n'est pas sulfaté et a une densité de charge relativement faible (une charge négative par dimère). En utilisant des HA sulfatés, la stabilité des nanoparticules est susceptible de s'améliorer en raison de sa densité de charge plus élevée qui lui confère une affinité de liaison plus élevée avec le chitosane chargé positivement. Pour cette raison, des nanoparticules HA-CS / ARNm avec des HA sulfatés et non sulfatés ont été préparées pour évaluer l'influence de la densité de charge de HA sur l'expression génique *in vitro*.

L'objectif de cette étude était de déterminer les formulations optimales de nanoparticules CS/ARNm recouvertes de HA pour la livraison de gènes en étudiant l'effet des différents paramètres de formulation sur la bioactivité *in vitro*. Le projet a été conçu pour évaluer systématiquement l'influence des propriétés structurales du CS et HA (poids moléculaires et densités de charge du chitosane et de l'acide hyaluronique) et la stœchiométrie des composants sur les propriétés physicochimiques des nanoparticules (NP) et l'efficacité de la transfection *in vitro*.

Les différentes formulations de nanoparticules produites ont été caractérisées par leur taille et leur charge de surface en utilisant la diffusion de lumière dynamique (DLS). Ensuite ces nanoparticules ont été transfectées *in vitro* dans des cellules humaines du cancer du poumon

exprimant la protéine EGFP (EGFP⁺ H1299) afin de normaliser le signal gène rapporteur (luciférase) avec la fluorescence EGFP et avoir ainsi des signaux relatifs à la densité cellulaire dans les puits. Les résultats ont démontré que les propriétés structurales des polyélectrolytes (masse molaire, densité de charge) ainsi que le ratio molaire des charges positives et négatives durant le mélange ont un impact sur la bioactivité *in vitro*. La formulation optimale pour la livraison chez les cellules EGFP⁺ H1299 a été déterminée. Il s'agit de nanoparticules ternaires qui ont été formées avec une charge de surface positive (excès de chitosane) en utilisant de l'acide hyaluronique de 10 kDa ayant 1.4 groupes sulfates par dimère en combinaison avec un chitosane ayant une densité de charge élevée et une masse molaire faible ou l'inverse (c.a.d. DDA=80% avec Mn=10kDa, ou DDA=92-98% avec Mn=5kDa). Ces formulations présentent un équilibre adéquat entre l'avidité du système et la facilité de libération de l'ARNm, résultant en un niveau d'expression amélioré. La présence du HA sulfaté dans les nanoparticules résulte en une augmentation de la capacité d'internalisation cellulaire de ces systèmes de livraison de gènes. De plus, il a été observé que la présence de tréhalose dans ces PEC permet aussi d'augmenter l'expression génique *in vitro*. Le mécanisme impliqué dans cette dernière observation demeure inconnu. Des études subséquentes sont nécessaires pour chercher à comprendre le mécanisme qui fait en sorte que le tréhalose améliore la bioactivité *in vitro* et de vérifier si ce phénomène est observé *in vivo*.

ABSTRACT

Among the different types of nanoparticles developed for gene delivery, polyelectrolyte complexes (PEC), or polyplexes, are a popular approach due to the ease of their production. Chitosan (CS) is one of the most studied biopolymers for the delivery of therapeutic compounds due to its à recognized beneficial properties (biocompatibility, biodegradability, lack of toxicity). When mixed with nucleic acid, there is a spontaneous formation of PEC via a process mainly driven by strong electrostatic attractions and an entropy gain associated with the release of counter-ions. Adding hyaluronic acid (HA) to CS/mRNA nanoparticles is a promising approach for mRNA delivery, due to the potential to combine the buffering capacity of chitosan (proton sponge effect) with improved hemocompatibility provided by the negatively charged HA, and receptor-mediated internalization of hyaluronic acid, which might lead to targeted delivery to numerous tumors that upregulate the expression of HA-receptors such as CD44 and RHAMM. Unlike other glycosaminoglycans (GAG), HA is not sulfated and has a relatively low charge density (one negative charge per dimer). By using sulfated HA polymers, nanoparticle stability is likely to improve due to the higher charge density of sulfated HA, which would lead to a higher binding affinity with the positively charged chitosan and an increased propensity for mRNA liberation in the cytoplasm, which is necessary for gene expression. For this reason, it was decided to prepare HA-CS/mRNA particles with sulfated as well as non-sulfated HAs to assess the influence of HA charge density on *in vitro* bioactivity.

The goal of the project is to perform a screening of HA coated CS/mRNA nanoparticles designed for mRNA delivery to study the effect of different formulation parameters on *in vitro* bioactivity. The project was designed to systematically evaluate the influence of CS and HA macromolecular properties (molecular weights and charge densities of chitosan and hyaluronic acid), and components stoichiometry on the physicochemical properties of the nanoparticles and their *in vitro* transfection efficiency.

The different formulations produced have been characterized for their size and surface charge using dynamic light scattering (DLS). Then these nanoparticles were transfected *in vitro* in human lung cancer cells expressing EGFP (EGFP⁺ H1299). Results suggest that the molecular properties of polyelectrolytes (molar mass, charge density) as well as the molar ratio of positive and negative charges during mixing have an impact on *in vitro* bioactivity. The optimal

formulation for delivery in EGFP⁺ H1299 cells was determined. These are HA-CS/mRNA nanoparticles that have been formed with a net positive charge (thus with an excess of chitosan) using chitosan having a degree of deacetylation greater than 80% and a molecular weight of less than or equal to 10 kDa, and using sulfated hyaluronic acid with 1.4 sulfate groups per dimer and a molar mass of 10 kDa. It appears that this formulation results in polyelectrolyte complexes that are stable enough to protect the mRNA from nucleases and deliver it to the cells, while allowing for release of the mRNA into the cytoplasm. The presence of sulfated HA has demonstrated increased cell internalization capacity. In addition, it has been observed that the presence of trehalose in polyelectrolyte complexes increases gene expression *in vitro*. The mechanism involved in this observation remains obscure. Subsequent studies are needed to understand the mechanism by which trehalose improves *in vitro* bioactivity and whether this phenomenon is observed *in vivo*.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES FIGURES SUPPLÉMENTAIRES	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Thérapie génique	1
1.2 Problématique.....	2
1.3 Objectif et hypothèses de recherche.....	3
1.4 Structure générale du mémoire	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 ARN messenger.....	5
2.1.1 Historique	5
2.1.2 Structure et Fonctions principale de l'ARNm.....	6
2.1.3 Potentiel thérapeutique de l'ARNm et obstacles à l'administration	8
2.1.4 Méthodes de livraison de l'ARNm.....	10
2.2 Le chitosane.....	14
2.2.1 Structure et propriétés physicochimiques du chitosane	14

2.2.2	Utilisation du chitosane dans des complexes polyélectrolytes.....	15
2.3	L'acide Hyaluronique.....	17
2.3.1	Structure et propriétés physicochimiques de l'acide hyaluronique.....	17
2.3.2	Utilisation du HA dans des complexes polyélectrolytes.....	18
2.4	Le tréhalose	20
2.5	Caractérisation des nanoparticules	21
2.5.1	Diffusion de lumière dynamique (DLS).....	21
2.5.2	Potentiel- ζ et diffusion de lumière électrophorétique (ELS).....	23
CHAPITRE 3 ARTICLE 1: IN VITRO EFFICACY OF CHITOSAN/HYALURONIC ACID BASED MRNA DELIVERY SYSTEMS: INFLUENCE OF COMPOSITION, HYALURONIC ACID SULFATION DEGREE, MOLECULAR WEIGHT AND STRUCTURAL PARAMETERS		26
3.1	Introduction	28
3.2	Materials and methods	30
3.2.1	Materials.....	30
3.2.2	Preparation and characterization of depolymerized chitosan.....	30
3.2.3	Preparation of CS, HA, and mRNA stock solutions	31
3.2.4	Preparation of Nanoparticles by Manual Mixing.....	32
3.2.5	Determination of Nanoparticle Size (Z-average,), Polydispersity, and Surface Charge	32
3.2.6	Cell culture and transfection	34
3.2.7	Assessment of Nanoparticle Toxicity Using the AlamarBlue Assay.....	35
3.2.8	Assessment of Nanoparticle Bioactivity (Luciferase expression).....	35
3.2.9	Hyaluronic Acid Competition	35
3.2.10	Statistical analysis	36

3.3	Results	36
3.3.1	Chitosan-mRNA nanoparticles bioactivity is similar to chitosan-plasmid nanoparticles, requiring a fine balance between DDA and Mn and slightly acidic pH.	36
3.3.2	HA coating influences nanoparticle size, surface charge and improves bioactivity. .	38
3.3.3	Addition of trehalose has no effect on nanoparticle size and polydispersity but greatly increases transfection efficiency at slightly acidic pH.	42
3.3.4	Hyaluronic acid competition suggests a role of receptor-mediated internalization in the improvement of nanoparticle bioactivity	45
3.3.5	Nanoparticle bioactivity can be further improved by optimizing mixing conditions with no metabolic effects.	47
3.4	Discussion	52
3.5	Conclusion.....	55
3.6	Acknowledgments.....	55
CHAPITRE 4	DISCUSSION GÉNÉRALE	60
CHAPITRE 5	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	64
BIBLIOGRAPHIE		66

LISTE DES TABLEAUX

Table 3-1. Characterization of Chitosans and Hyaluronic Acids Tested in This Study. Different chitosans and hyaluronic acids denoted according to their chemical composition using the nomenclature [CS:DDA-Mn] and [HA:DS-Mn] respectively are listed in the first column of the table. The degree of deacetylation (DDA) was determined by ^1H NMR. The number and weight average molecular weight (M_n and M_w) were determined by SEC-MALS. The polydispersity index (PdI) was calculated as M_w/M_n . The degree of sulfation (DS) and M_n of HAs were provided by the manufacturer on the certificates of characterization.....	31
Tableau 4-1. Comparaison des paramètres optimaux pour la livraison d'ARNm, ARNi et ADNp in vitro.	60

LISTE DES FIGURES

- Figure 2-1. Structure moléculaire d'un brin d'ARNm. Quatre formes possibles des nucléotides, différant au niveau de la base azotée liée au ribose. (C : Cytosine, G : Guanine, A : Adénine, U: Uracile). Adapté de <http://www.scienceprofonline.com/genetics/nucleic-acid-function-DNA-replication-transcription-translation-3.html>, consulté le 9 avril 2018. Domaine public.6
- Figure 2-2. Fonction biologique de l'ARNm. Adapté de: https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique_messenger#/media/File:MRNA_f_r.svg, consulté le 15 avril 2018. Domaine public.....7
- Figure 2-3. Structure chimique du chitosane avec unités désacétylées glucosamine (D-unit) et acétylé N-acetyl glucosamine (A-unit) récurrents aléatoirement et à intervalle variable dépendant du degré de désacétylation du chitosane. Adaptée de (Buschmann et al., 2013) © Elsevier 2018, reproduit avec permission.14
- Figure 2-4. Structure chimique du disaccharide récurrent de l'acide hyaluronique. Adapté de (Kogan, Soltes, Stern, & Gemeiner, 2007). © Springer Nature 2018, reproduit avec permission.18
- Figure 2-5. Structure chimique du tréhalose. Adapté de (Feofilova, Usov, Mysyakina, & Kochkina, 2014).© Springer Nature 2018, reproduit avec permission.....20
- Figure 2-6. Instrumentation pour effectuer des mesures en diffusion de lumière dynamique. Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission22
- Figure 2-7. Structure des couches d'ions d'une nanoparticule en suspension dans un milieu de dispersion soumis à un champ électrique. Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission24
- Figure 2-8. Instrumentation pour effectuer des mesures en diffusion de lumière électrophorétique (ELS). Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission25
- Figure 3-1 Effect of DDA, Mn, and amine to phosphate ratio (N:P) on nanoparticle size, polydispersity index, and ζ -potential Nanoparticles were prepared in water and physicochemical parameters measured using dynamic light scattering. A) Nanoparticle size

(Z-average in nm), B) Nanoparticle polydispersity, C) Nanoparticle ζ -potential in mV. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6).37

Figure 3-2. Effect of DDA, Mn, amine to phosphate ratio (N:P) and pH on nanoparticles in vitro bioactivity in presence of 10 % FBS. Nanoparticles were formed in water following a 1:1 (v/v) mixing ratio at an FLuc mRNA concentration of 0.1 mg/mL. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at a final mLuc dose of 150ng/well. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6). Luciferase expression was normalized to mean EGFP expression. The media pH was adjusted to the specific values in the caption (i.e. 6.5, 6.9 and 7.3) by buffering the RPMI-1640 media with MOPS.38

Figure 3-3 Effect of chitosan and hyaluronic acid parameters on nanoparticle size, polydispersity and ζ -potential. Effect of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and hyaluronic acid molecular weight, degree of sulfation and phosphate to carboxyl molar ratio on A) nanoparticle size, B) nanoparticle polydispersity and C) nanoparticle ζ -potential. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6).40

Figure 3-4. Effect of HA degree of sulfation, molecular weight, and P:C ratio on in vitro bioactivity. Nanoparticles were formed in water using a two-step methodology where chitosan and mRNA (0.15 mg/mL) were manually mixed at 1:1 (v/v) ratio, incubated for 10 min and coated with different hyaluronic acids (DS, Mn) at either P:C 1 (positive particles) or 7 (negative particles). EGFP⁺ H1299 cells were transfected in the presence of 10% FBS, pH 6.5, at a final mRNA dose of 150 ng/well. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6). The media pH was adjusted to pH 6.5 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.41

Figure 3-5. Minimal effect of trehalose concentration during mixing on nanoparticle size and polydispersity index. A) Effect of trehalose concentration (w/w) on uncoated and HA-coated nanoparticle size (Z-average); HA 1.4S-10 kDa N:P:C 5:1:1. B) Effect of trehalose concentration (w/w) on uncoated and HA-coated nanoparticle polydispersity index. Data

represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment ($N = 3$, $n = 6$).43

Figure 3-6. Effect of increasing trehalose concentrations on the bioactivity of uncoated and HA-coated (1.4 S) nanoparticles. Nanoparticles were formed in the presence of increasing trehalose concentrations (w/w) using a two-step methodology where chitosan and mRNA (0.15 mg/mL) were manually mixed at 1:1 (v/v) ratio, incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (Low Mn of 10 kDa, and a degree of sulfation of 1.4) at a P:C of 1:1 (positive particles). EGFP⁺ H1299 cells were transfected in the presence of 10% FBS, at pH 6.5 in (A) or 7.3 (B), at a final mRNA dose of 150 ng/well. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment ($N = 2$, $n = 4-6$). The media pH was adjusted to pH 6.5 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.44

Figure 3-7 Effect of hyaluronic acid competition on nanoparticle bioactivity and toxicity. EGFP⁺ H1299 cells were treated with 30X HA for 30 min prior to transfection with HA (low Mn, 1.4 S) coated nanoparticles and compared to controls 48 hours post-transfection in the presence of 10% FBS, pH 6.5. A) Bioactivity of nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:1 (positively charged). B) metabolic activity of cells treated with nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:1 (positively charged) in the presence and absence of competing HA molecules. C) Bioactivity of nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:7 (negatively charged). Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment ($N = 2$, $n = 4-6$). The media pH was adjusted to pH 6.5–6.7 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.....46

Figure 3-8. Influence of nucleic acid concentration during mixing on nanoparticle size, polydispersity and ζ -potential in the presence and absence of trehalose. A) Influence of FLuc mRNA concentration at the time of mixing on the size of hyaluronic acid coated (HA:1.4S-10 kDa) nanoparticles prepared at a P:C ratio of 1. B) Influence on the polydispersity index of the nanoparticles. C) Influence on nanoparticle ζ -potential. Data represent the average $\pm$

standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6).....48

Figure 3-9 Effect of nucleic acid concentration and dose on coated nanoparticle bioactivity in the presence/absence of trehalose. Nanoparticles were formed in the absence (0 %) or presence (10 %) of trehalose using a two-step methodology where chitosan (CS: 80-10) was manually mixed at 1:1 (v/v) ratio with increasing concentrations of mRNA (75 to 450 µg/mL), incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (HA: 1.4S-10 kDa) at a P:C 1 (positive particles) using a particle to HA volumetric ratio of 2:1. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at increasing nucleic acid doses and in the presence of 10% FBS, at either pH 6.5 in (A) or 7.3 (B). Data represent average ± standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6).49

Figure 4-1. Résultats principaux de la seule autre publication traitant sur des systèmes ternaires HA-CS/ARNm. L'expression d'ARNm et d'ARNsi est présenté suite à la transfection de différentes formulations de particules ternaires à pH physiologique (7.4) et intra-tumoral (6.5). Adaptée de (Lallana et al., 2017). © American Chemical Society 2018, reproduit avec permission62

LISTE DES FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

- Figure S. 3-1 Effect of centrifugation on nanoparticle bioactivity. Nanoparticles were formed in the absence (0 %) or presence (10 %) of trehalose using a two-step methodology where chitosan (CS: 80-10) was manually mixed at 1:1 (v/v) ratio with increasing concentrations of mRNA (75 to 450 $\mu\text{g/mL}$), incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (HA: 1.4S-10 kDa) at a P:C 1 (positive particles). EGFP⁺ H1299 cells were transfected at increasing nucleic acid doses and in the presence of 10% FBS, pH 6.5. Plates were then subjected to centrifugation (2000 g) for 45 min to force contact between nanoparticles and cells and compared with plates without centrifugation. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6).50
- Figure S. 3-2 Effect of nucleic acid concentration and dose on coated nanoparticle metabolic activity (toxicity) in the presence/absence of trehalose. Nanoparticles were formed and transfected as described in Figure 3-9. Metabolic activity was measured using the alamarBlue assay 48 h post transfection. A) Transfection performed at pH 6.5. B) Transfection performed at pH 7.3. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6).51

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

H-NMR	Résonance nucléaire magnétique
ApoE	Apolipoprotéine E
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine de sérum bovin
CS	Chitosane
Da	Dalton, unité de masse molaire
DDA	Degré de déacétylation
DS	Degré de sulfatation
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
ELS	Diffusion électrophorétique de la lumière (<i>Electrophoretic Light Scattering</i>)
EGFP	Protéine fluorescente verte renforcée (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
H1299	Lignée de cellules pulmonaires d'adénocarcinome humain
HA	Acide hyaluronique
LDL	Lipoprotéine de basse densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LNP	Nanoparticules lipidique (<i>Lipid Nanoparticles</i>)
N :P :C	Ratio molaire entre les fonctions amines du chitosane (N), les phosphates de l'acide nucléique (P) et les charges associés aux fonctions carboxyle et sulfate de l'acide hyaluronique (C)
PEC	Complexe polyélectrolyte (<i>Polyelectrolyte Complex</i>)
kDa	Kilo Dalton, 1000 Daltons
GAG	Glycosaminoglycane

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Thérapie génique

Les modalités de traitement traditionnelles reposent sur l'utilisation de molécules et de composés biologiques pour stimuler ou inhiber une réponse physiologique, conduisant à un effet thérapeutique. Cette approche s'est avérée efficace pour contrôler ou soulager des symptômes, sans nécessairement guérir le patient de sa maladie. Des avancées technologiques en génie génétique, couplé à des progrès dans la compréhension des mécanismes biologiques qui causent certaines pathologies, offrent l'opportunité d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La thérapie génique est une approche en développement visant à utiliser des acides nucléiques pour traiter ou prévenir des maladies. En contraste avec les thérapies traditionnelles, la thérapie génique offre la possibilité de traiter les causes sous-jacentes de la maladie.

Initialement, le paradigme en thérapie génique était de remplacer des gènes défectueux par leur contrepartie normale. Concrètement, ceci peut se faire en injectant une séquence d'ADN fonctionnelle correspondante à la séquence du gène cible dysfonctionnel à l'intérieur de cellules cibles (Horton, 2006). Ces gènes fonctionnels seront ensuite transcrits dans le noyau en une séquence d'ARNm. Ce dernier sera ensuite traduit en une séquence d'acides aminés ayant la séquence appropriée, permettant la formation d'une protéine biologiquement active et fonctionnelle. Quoique la livraison d'acides nucléiques demeure un défi de taille, une alternative plus simple consiste à injecter une séquence d'ARN messager (ARNm) correspondante dans le cytoplasme de la cellule pour éviter l'obstacle majeur que représente l'internalisation d'un brin d'ADN exogène dans un noyau cellulaire (Phua, Leong, & Nair, 2013; Schlake, Thess, Fotin-Mleczek, & Kallen, 2012). De cette façon, l'étape de transcription dans le noyau est évitée; il ne reste que l'étape de traduction de l'ARNm en séquence d'acide aminé.

Cependant, l'application thérapeutique d'ARNm a jusqu'à récemment été limitée par son instabilité *in vivo* (Pardi, Hogan, Porter, & Weissman, 2018). Plusieurs barrières physiologiques empêchent l'administration d'acides nucléiques, incluant leur susceptibilité à la dégradation par des nucléases et l'internalisation cellulaire limitée. Pour remédier à ces obstacles, les stratégies en développement incluent des modifications chimiques de l'ARNm (Pardi et al., 2018) ainsi que le développement de systèmes de livraison de gènes. Les systèmes de livraison encapsulant le

matériel génétique visent à protéger les acides nucléiques de la dégradation par les nucléases ainsi que de faciliter l'internalisation à travers la membrane cytoplasmique (Koping-Hoggard et al., 2001; Nimesh, Thibault, Lavertu, & Buschmann, 2010; Sato, Ishii, & Okahata, 2001; Strand, Issa, Christensen, Varum, & Artursson, 2008).

Les systèmes les plus avancés dans les essais cliniques sont composés de nanoparticules à base de lipides et de polymères ou de conjugués moléculaires (Fitzgerald, White, et al., 2017; Wittrup & Lieberman, 2015). Les nanoparticules lipidiques (LNP) cationiques sont les systèmes de livraison de gène ayant démontré l'efficacité la plus élevée *in vivo* comparés aux autres systèmes en développement. Dans le cadre de ce projet, l'étude porte sur les complexes polyélectrolytes (PEC) à base de chitosane (CS) et d'acide hyaluronique (HA) en tant que système de livraison d'ARNm. Ces nanoparticules sont faciles à produire et leurs caractéristiques physicochimiques influençant la toxicité et la bioactivité peuvent facilement être adaptées en changeant la masse molaire et/ou la densité de charge des composantes du système (CS et HA).

1.2 Problématique

Bien que plusieurs types de PEC aient été étudiés pour la livraison d'ARN interférent et d'ADN plasmidique, les études concernant la livraison d'ARNm sont limitées. L'optimisation de PEC pour maximiser la bioactivité de l'acide nucléique dépend de la nature de l'acide nucléique utilisé. Considérant les différences structurelles évidentes entre les séquences d'ADN plasmide circulaires et double brin, les petits ARN interférents, ou les ARN messagers qui sont simples brins et de plus grande taille que les ARN interférent (Horton, 2006), les paramètres optimaux pour la production de nanoparticules ne seront pas les mêmes (Alameh et al., 2018; Lavertu, Methot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006; Malmo, Sorgard, Varum, & Strand, 2012; Thibault, Nimesh, Lavertu, & Buschmann, 2010), d'où la nécessité d'effectuer un dépistage afin de déterminer les paramètres de production optimaux pour produire des vecteurs de transport d'ARNm efficaces.

Question de recherche : Quels sont les paramètres optimaux pour une livraison efficace de l'ARNm *in vitro* en utilisant des systèmes de livraison composés de chitosane et d'acide hyaluronique ?

1.3 Objectif et hypothèses de recherche

L'étude présentée dans ce mémoire visait à optimiser l'expression génique *in vitro* suite à la transfection d'ARNm par l'entremise d'un système de livraison à base de chitosane et d'acide hyaluronique. En utilisant des chitosanes et des acides hyaluroniques ayant différentes longueurs et densité de charge, des complexes polyélectrolytes encapsulant l'ARNm ont été préparés à différentes stœchiométries molaires de groupes ionisables. La taille, la charge de surface et la bioactivité *in vitro* de ces nanoparticules ont été caractérisées. Après avoir mesuré l'expression d'un gène rapporteur *in vitro* pour plus de 60 différentes combinaisons de nanoparticules transfectées, les différents niveaux d'expression obtenus ont été comparés pour des nanoparticules formées de combinaisons de polyélectrolytes (CS et HA) différant par leur masse molaire et leur densité de charge, ainsi que leur ratio molaire de charges entre les groupes ionisables de chaque polymère (N :P :C). De cette manière, il a été possible de maximiser la bioactivité *in vitro* et limiter la cytotoxicité.

L'identification des formulations optimales a été effectué en faisant varier les facteurs suivants :

- Masse molaire du chitosane (Mn)
- Degré de déacétylation du chitosane (DDA)
- Masse molaire de l'acide hyaluronique (Mn)
- Degré de sulfatation (DS) de l'acide hyaluronique
- Ratios molaires entre les groupes amine du chitosane (N), les groupes phosphate de l'ARNm (P) et les fonctions carboxyle et sulfate de l'HA (C)
- Présence ou absence de tréhalose comme agent stabilisant

Hypothèses :

- Les nanoparticules ayant une charge de surface positive présenteront une meilleure efficacité de transfection *in vitro* par rapport aux nanoparticules préparées avec une charge de surface négative dû à la nature anionique de la membrane cellulaire.
- Les nanoparticules préparées avec du chitosane de grand poids moléculaire auront une efficacité réduite due à une condensation trop forte des nanoparticules, limitant la libération intracellulaire de l'ARNm de façon similaire aux systèmes CS/ADNp. (Lavertu et al., 2006; Thibault et al., 2010)

- L'ajout de HA sulfaté dans les nanoparticules augmentera l'efficacité de la transfection par rapport aux HA non sulfatés en raison de sa densité de charge plus élevée, résultant en une compétition accrue avec l'ARNm et une libération intracellulaire facilitée.

1.4 Structure générale du mémoire

Le chapitre suivant (**Chapitre 2**) vise à faire une synthèse sur l'état de l'art concernant l'utilisation thérapeutique de l'ARNm. Le lecteur est invité à consulter les revues citées s'il désire plus de détails sur des sujets particuliers.

Le **Chapitre 3** représente le cœur de l'ouvrage et présente une publication intitulée *In vitro Efficacy of Chitosan/Hyaluronic Acid based mRNA Delivery Systems : Influence of Composition, Hyaluronic Acid Sulfation Degree, Molecular Weight and Structural Parameters*, soumis à **Biomacromolecules**. Ce qui est présenté dans cet article constitue la totalité des expériences effectuées dans le cadre de ce mémoire. Ce chapitre inclut donc la liste exhaustive du matériel, la méthodologie expérimentale complète et la totalité des résultats obtenus.

Le **Chapitre 4** présente une discussion générale des résultats obtenus en lien avec la revue de littérature présenté dans le **Chapitre 3**. Finalement, le **Chapitre 5** correspond à la conclusion, incluant des recommandations pour les perspectives de recherche futures qui pourraient suivre les résultats présentés dans le **Chapitre 3**.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre vise à informer le lecteur sur tous les concepts et composantes nécessaires à la compréhension de ce mémoire. Tout d'abord, l'ARN messenger est présenté en commençant avec l'historique qui a mené à sa découverte, suivie par une brève description de son rôle biologique primaire ainsi que son potentiel thérapeutique. En deuxième lieu, les obstacles liés à la livraison d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo* sont présentés, suivis par une description générale des vecteurs de transport à l'étude pour la livraison d'ARNm. Ensuite, les composantes utilisées pour produire les systèmes de livraison dans cette étude (chitosane, acide hyaluronique, trehalose) sont présentées. Finalement, la théorie derrière les techniques de mesure de la taille et de la charge de surface des nanoparticules sera présentée.

2.1 ARN messenger

2.1.1 Historique

En 1953, James D. Watson et Francis H.C. Crick ont proposé une structure moléculaire pour l'ADN (Horton, 2006). La structure de l'ADN proposée par Watson et Crick suggère la nécessité d'un processus de réplication de l'ADN pour transférer l'information génétique d'une génération à l'autre. George Beadle et Edward Tatum ont proposé qu'une seule unité d'hérédité, ou gène, dirige la production d'une seule enzyme (Horton, 2006). Une démonstration complète de la relation entre les gènes et les protéines est venue en 1956, quand Vernon Ingram a montré que l'hémoglobine de patients atteints d'anémie falciforme héréditaire différait de l'hémoglobine normale par le remplacement d'un seul acide aminé (Ingram, 1956). Les résultats d'Ingram indiquent que des changements génétiques peuvent se manifester en un changement dans la séquence des acides aminés d'une protéine. Donc il a été possible de conclure que l'information contenue dans un génome décrit la structure primaire de chaque protéine de l'organisme. Un gène est défini comme étant une séquence d'ADN qui est transcrite (Horton, 2006). Cette définition inclut les gènes qui ne codent pas pour des protéines. Lorsqu'un gène code pour une protéine, ceci est effectué par l'entremise de l'acide ribonucléique messenger (ARNm), ayant comme fonction principale de mener la séquence d'un gène à la machinerie qui traduit cette séquence pour synthétiser les protéines de l'organisme (**Figure 2-2**). La découverte de l'ARNm est

largement attribuée au travail de François Jacob et Jacques Monod ainsi que leurs collaborateurs à l'institut Pasteur (Paris, France) (Horton, 2006).

2.1.2 Structure et Fonctions principale de l'ARNm

Il existe plusieurs types d'acides ribonucléiques dans l'organisme (Horton, 2006), l'ARN de transfert (ARNt) transporte les acides aminés vers les complexes de traduction. L'ARN ribosomale (ARNr) constitue une grande partie du ribosome. De petites molécules d'ARN participent dans divers processus métaboliques. Finalement, l'ARN messager (ARNm) correspond à une copie complémentaire d'un gène de l'ADN, ayant le rôle d'intermédiaire entre la séquence d'un gène contenu dans l'ADN et la synthèse de protéines. C'est-à-dire que l'ARNm transcrit le gène qui se trouve dans le noyau et achemine la séquence au cytoplasme pour permettre la traduction en protéine.

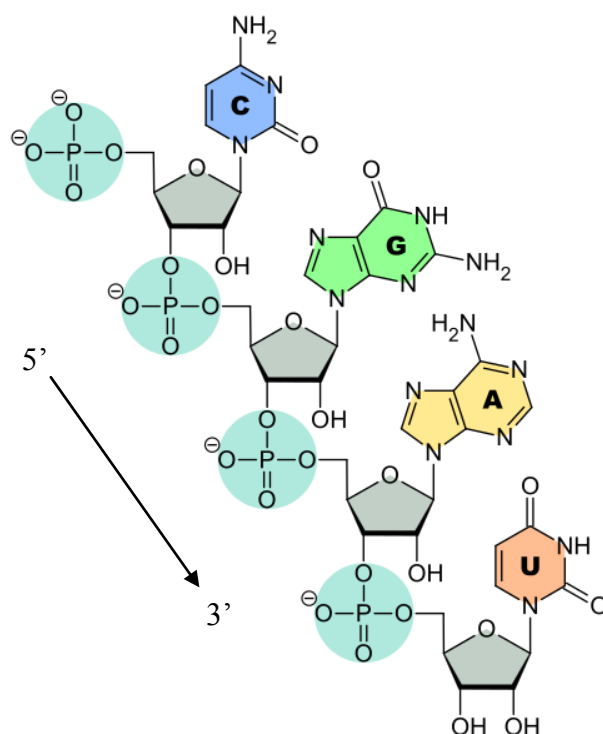


Figure 2-1. Structure moléculaire d'un brin d'ARNm. Quatre formes possibles des nucléotides, différant au niveau de la base azotée liée au ribose. (C : Cytosine, G : Guanine, A : Adénine, U: Uracile). Adapté de <http://www.scienceprofonline.com/genetics/nucleic-acid-function-DNA-replication-transcription-translation-3.html>, consulté le 9 avril 2018. Domaine public.

L'ARN est un polyélectrolyte anionique formé d'unités de nucléotides liées par des liens covalents. Ces polymères ont une extrémité phosphoryle, appelée extrémité 5', et une extrémité hydroxyle, ou 3'. Ceux-ci définissent la direction 5' → 3' (**Figure 2-1**). L'ARN et l'ADN diffèrent dans leur structure sur trois aspects. Premièrement, les nucléotides de l'ARNm contiennent un ribose, alors qu'il s'agit plutôt d'un désoxyribose dans le cas de l'ADN. Deuxièmement, l'ADN est formé de deux brins complémentaires de directions opposées alors que l'ARNm est simple brin. Troisièmement, l'ARNm remplace la thymine par l'uracile en tant que base azotée complémentaire à l'adénine. Chaque nucléotide de l'ARNm est formé d'un ribose lié à un groupe phosphate et une base azotée. Les groupes phosphates sont présents à intervalle régulier tout au long de la chaîne de l'ARNm. Puisque le pKa du groupe phosphate est près de 0, ce groupe fonctionnel maintient une charge négative en milieu physiologique. La nature anionique des acides nucléiques peut être exploitée pour le développement de nanoparticules.

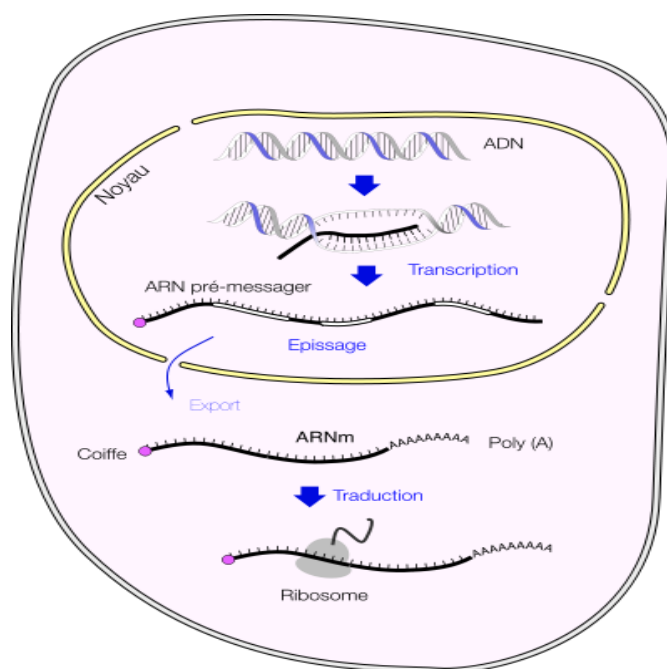


Figure 2-2. Fonction biologique de l'ARNm. Adapté de:

https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ribonucl%C3%A9ique_messager#/media/File:MRNA_fr.svg, consulté

le 15 avril 2018. Domaine public

Tel qu'illustré dans la **Figure 2-2**, le mécanisme de synthèse des protéines est médié par l'ARNm. D'abord, un gène présent dans l'ADN est transcrit sous forme d'ARNm à l'aide de divers enzymes, dont l'ARN polymérase, en suivant la direction 3' à 5' de l'ADN donnant une séquence complémentaire d'ARNm allant de 5' à 3'. Ensuite, l'ARNm subit un épissage (coupure de certaines régions de l'ARNm), permettant d'obtenir la séquence finale codant pour une protéine donnée. À l'ARN s'ajoute une coiffe à l'extrémité 5' et une queue poly-A à l'extrémité 3', lui conférant un certain degré de stabilité. L'ARNm mûr quitte alors le noyau vers le cytoplasme, où il va se s'incorporer aux ribosomes pour traduire le gène transcrit en séquence d'acides aminés (Horton, 2006).

Chez les procaryotes, il a été observé que la majorité de l'ARN cytoplasmique est sous la forme d'ARNr, alors qu'une très petite fraction (~3%) correspond aux ARNm (Horton, 2006). Toutefois, l'ARNm a un taux de synthèse beaucoup plus élevé comparé aux autres ARN, car l'ARNm est beaucoup moins stable que l'ARNr ou l'ARNt et se dégrade donc plus rapidement (Horton, 2006). Le taux de dégradation des ARNm (ou taux de demi-vie) dépend de plusieurs facteurs dans l'environnement de la cellule et permet ainsi de réguler l'expression de différents gènes en fonction du contexte cellulaire.

2.1.3 Potentiel thérapeutique de l'ARNm et obstacles à l'administration

L'utilisation d'acides nucléiques en tant qu'agents thérapeutiques est considérée comme une stratégie prometteuse. En tant que classe émergente d'acide nucléique thérapeutique, l'utilisation de l'ARNm présente des avantages clairs en contraste à l'utilisation de l'ADN plasmidique. Au niveau de la sécurité d'utilisation, l'ARNm présente une meilleure alternative à l'ADNp. En effet, l'ARNm ne contient aucun promoteur viral (ex : CMV) ni de séquence bactérienne pouvant induire une toxicité. De plus, l'ARNm ne peut pas s'insérer dans le génome des cellules transfectées, donc il n'y a pas de risque de mutagenèse insertionnelle (Wurtele, Little, & Chartrand, 2003) contrairement à l'ADNp. Soulignons aussi qu'étant donné que l'ARNm est l'intermédiaire entre la traduction de l'ADN codant pour une protéine et la synthèse de la protéine en question, il offre un avantage par rapport à l'ADNp au niveau de l'efficacité thérapeutique. N'ayant pas besoin de traverser l'enveloppe nucléaire pour accomplir sa fonction, les chances de succès sont augmentées avec l'ARNm (Probst et al., 2007). Il est à noter que puisque l'ARNm est moins stable que l'ADNp, son utilisation pour exprimer une protéine

fonctionnelle pourrait nécessiter des injections multiples à une fréquence plus élevée comparée à l'ADNp.

Outre les applications en livraison de gènes, l'ARNm présente un potentiel important en tant qu'agent de vaccination. La vaccination est le processus par lequel des substances appelées antigènes sont introduites dans le corps pour stimuler le système immunitaire. Ces antigènes sont généralement des agents infectieux - des agents pathogènes - qui ont été inactivés par la chaleur ou par un traitement chimique, de sorte qu'ils ne provoquent pas de maladie. Les antigènes peuvent également être des protéines purifiées provenant des agents pathogènes. L'exposition du corps aux antigènes conduit à la production de molécules spécifiquement dirigées contre eux, appelées anticorps. Les anticorps permettent une réponse plus rapide et efficace du système immunitaire contre une infection réelle (Schlake et al., 2012). Pour un vaccin classique, l'antigène est introduit dans le corps pour produire une réponse immunitaire. Cependant, dans le cas des vaccins à base d'ADN ou d'ARNm, aucun antigène n'est introduit, seul l'acide nucléique contenant l'information génétique pour produire l'antigène est injecté. Autrement dit, pour cette classe spécifique de vaccins, l'introduction d'ADN et d'ARNm fournit les instructions à l'organisme pour produire l'antigène lui-même (Schlake et al., 2012). Suite à l'injection d'ARNm, les cellules dendritiques utiliseront la séquence d'ARN de l'antigène pour synthétiser la protéine et la présenter sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Bol et al., 2015). Par la suite, les cellules dendritiques, maintenant nommées cellules présentatrices d'antigène (CPA), migreront vers les ganglions lymphatiques et activeront les lymphocytes Th (Hirose & Dubrot, 2015) afin de stimuler la réponse immunitaire et produire des anticorps spécifiques à l'antigène, des cellules cytotoxiques et des cellules mémoires.

La première étude réussie portant sur l'utilisation de l'ARNm transcrit *in vitro* chez des animaux a été publiée en 1990. Dans cette étude, des gènes rapporteurs ont été injectés chez des souris et la production de la protéine associée à ce gène a été détectée (Wolff et al., 1990). Une étude subséquente, publiée en 1992, a démontré que l'administration dans l'hypothalamus d'ARNm codant pour la vasopressine induisait une réponse physiologique chez les rats (Jirikowski, Sanna, Maciejewski-Lenoir, & Bloom, 1992). Pour la vaccination à base d'ARNm, l'intérêt a débuté en 1996, suivant les résultats d'une étude qui a démontré que des cellules dendritiques pulsées avec de l'ARNm sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes *in vitro* et *in vivo* (Boczkowski, Nair, Snyder, & Gilboa, 1996).

Ces résultats n'ont pas conduit à un investissement important dans le développement de produits thérapeutiques à base d'ARNm. Ce manque d'intérêt était principalement dû à l'instabilité de l'ARNm et à son immunogénicité élevée. Au lieu de l'ARNm, les recherches ont mis l'accent sur des approches thérapeutiques utilisant l'ADN (Pardi et al., 2018). Toutefois, il a été découvert par la suite qu'il est possible de moduler l'immunogénicité inhérente de l'ARNm à la baisse (Kariko et al., 2008; Thess et al., 2015) avec des modifications des nucléosides, telle que la substitution de pseudo-uridines (Kariko et al., 2008). De plus, certaines modifications structurelles de l'ARNm, telles que la modulation de la longueur de la queue poly-A (Holtkamp et al., 2006) et l'ajout d'analogues de coiffe modifiés (Kuhn et al., 2010), permettent de réguler la stabilité de cet acide nucléique, résultant en une amélioration de l'efficacité de transfection de l'ARNm nu *in vivo*. Bref, au cours des dernières décennies, des innovations technologiques majeures ont permis à l'ARNm de devenir un outil thérapeutique prometteur dans le domaine du développement de vaccins.

Malgré les modifications structurelles de l'ARNm lui conférant une meilleure stabilité, cet acide nucléique demeure vulnérable aux nucléases avant d'atteindre les cellules cibles. Pour être en mesure d'accomplir son rôle thérapeutique *in vivo*, l'ARN messager doit pénétrer les cellules cibles en traversant la membrane cytoplasmique, se libérer de l'endosome et entrer en contact avec les ribosomes. Dans le cas d'une administration intraveineuse, ceci est précédé par une navigation dans la circulation sanguine, une extravasation et une diffusion locale pour entrer en contact avec les cellules. Tout cela en évitant la dégradation par les nucléases. Si on effectue une livraison locale, il est possible de contourner les obstacles liés à la circulation sanguine et l'extravasation. Toutefois, considérant la répulsion électrostatique entre l'ARNm chargé négativement et les membranes cytoplasmiques ayant aussi une charge nette négative, la diffusion passive et l'internalisation de ces molécules restent limitées (Dowdy, 2017). Dans le contexte de cette étude, on se limite aux obstacles d'internalisation cellulaire et de libération endosomale, puisque ces obstacles peuvent être adressés dans des études de transfection *in vitro*.

2.1.4 Méthodes de livraison de l'ARNm

Parmi les différentes méthodes envisagées pour améliorer l'internalisation cellulaire de l'ARNm, l'électroporation *ex vivo* a émergé comme étant une méthode populaire pour transfecter des cellules dendritiques (Van Tendeloo et al., 2001). L'électroporation est une technique dans

laquelle un champ électrique est appliqué aux cellules afin d'augmenter la perméabilité de leur membrane cellulaire (Aarntzen et al., 2012; Van Tendeloo et al., 2001), permettant l'introduction de l'ARNm, dans les cellules. Une approche de vaccination *ex vivo* consiste donc à transfecter par électroporation des cellules dendritiques autologues du sang avec le l'ARNm codant pour un antigène tumoral et de les réinjecter dans l'organisme (Aarntzen et al., 2012). Cette approche d'électroporation *ex-vivo* permet d'avoir un contrôle précis de la cible cellulaire à transfecter en assurant une efficacité satisfaisante. Cependant, cette approche *ex vivo* est laborieuse et demande l'accès à de l'équipement dispendieux.

Une deuxième approche populaire est l'injection parentérale directe de l'ARNm nu ou d'ARNm encapsulé dans un vecteur de livraison. L'injection directe de l'ARNm est une approche plus abordable et rapide, mais elle ne permet pas d'effectuer une livraison précise et efficace à un type cellulaire ciblé, bien qu'il y ait eu des progrès récents à cet égard (Kranz et al., 2016).

Le peptide cationique protamine a démontré une capacité de protection de l'ARNm de la dégradation par les RNAses (Hoerr, Obst, Rammensee, & Jung, 2000). Pour une application de vaccination contre le cancer, l'exposition des cellules dendritiques avec des antigènes tumoraux peut stimuler une immunité (voir section **2.1.3**) anti tumorale puissante (Bol et al., 2015; Kubler et al., 2015). Cependant, l'ARNm complexé avec la protamine seule présente des niveaux d'expression limités dans un modèle de vaccination contre le cancer. Ces niveaux d'expressions limités peuvent être en raison d'une affinité trop forte entre la protamine et l'ARNm, limitant la libération de l'acide nucléique dans le cytoplasme (Fotin-Mleczek et al., 2011; Schlake et al., 2012).

La livraison de l'ARNm par son encapsulation dans des nanoparticules présente des avantages potentiels, dont le plus important étant la possibilité d'administration *in vivo* de vaccins à base d'ARNm sans manipulation *ex vivo*. L'encapsulation de l'ARNm dans des nanoparticules permet aussi de protéger l'ARNm de la dégradation par les nucléases, de faciliter l'internalisation cellulaire et de promouvoir la libération endosomale par différents mécanismes suggérés dans la littérature, tels que la formation de pores dans la membrane endosomale, l'effet d'éponge protonique (tamponnage du pH dans l'endosome), ou la fusion avec la membrane endosomale, plus particulièrement avec les particules lipidiques (Varkouhi, Scholte, Storm, & Haisma, 2011), cette dernière étant l'étape la plus limitante dans la livraison d'acide nucléique (Dominska &

Dykhhoorn, 2010; Dowdy, 2017; Fitzgerald, Kallend, & Simon, 2017; Wittrup et al., 2015). La livraison de l'ARNm par l'entremise de nanoparticules a été explorée en utilisant des particules composées des complexes polyélectrolytes (Al-Qadi, Alatorre-Meda, Zaghloul, Taboada, & Remunan-Lopez, 2013; Alameh et al., 2018; Almalik, Day, & Tirelli, 2013; Buschmann et al., 2013; Corbet et al., 2016; Ji et al., 2009; Lallana et al., 2017) , des particules lipidiques (Kedmi, Ben-Arie, & Peer, 2010; Lv, Zhang, Wang, Cui, & Yan, 2006; Perche et al., 2011; Su, Fricke, Kavanagh, & Irvine, 2011; Wittrup et al., 2015), ou des particules hybrides composées de polymères et de lipides (Su et al., 2011) parmi tant d'autres.

Les nanoparticules lipidiques (LNP) sont l'un des systèmes les plus attrayants et couramment utilisés. Ces derniers comprennent généralement quatre éléments : un lipide cationique ionisable favorisant l'auto assemblage à des tailles autour de 100 nm, du cholestérol, un agent stabilisant et des phospholipides naturels. Les LNP ciblent naturellement les hépatocytes grâce à l'endocytose médiée par LDLr-ApoE (Akinc et al., 2010). L'interaction électrostatique entre les lipides ayant un groupe cationique et le l'acide nucléique chargé négativement génère des structures multi lamellaires avec des bicouches lipidiques chargées positivement séparées les unes des autres par des couches d'acides nucléiques chargées négativement (Schroeder, Levins, Cortez, Langer, & Anderson, 2010). L'ajout de co-lipides tels que le lipide fusogène dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) démontre une libération endosomale améliorée en raison d'un mécanisme de fusion du lipoplexe avec la membrane endosomale (Chang, Higuchi, Kawakami, Yamashita, & Hashida, 2010; Varkouhi et al., 2011). Toutefois, les nanoparticules cationiques, incluant les LNP cationiques, sont associées à une dissociation spontanée (Buyens et al., 2010; Zelphati, Uyechi, Barron, & Szoka, 1998), et à une forte toxicité in vivo (Buyens et al., 2010; Knudsen et al., 2015; Lv et al., 2006) du à leur charge nette positive à la surface. Il est à noter que ce problème est commun à tous les systèmes de livraison ayant une surface chargée en raison des interactions avec les protéines dans l'organisme. Cette toxicité peut néanmoins être diminuée en greffant des chaines de polyéthylène-glycol (PEG) (Lechanteur et al., 2016) à la surface des nanoparticules. Ceci réduit aussi la capacité d'internalisation des particules (Corbet et al., 2016; Lechanteur et al., 2016). Une bioactivité améliorée a été obtenue avec des liposomes recouverts de PEG conçus pour se dissocier à des taux contrôlés, déplaçant ainsi de façon dynamique l'équilibre entre la toxicité et l'efficacité d'expression au fil du temps (Romberg, Hennink, & Storm, 2008).

Les complexes polyélectrolytes (PEC) sont des nanosystèmes fréquemment utilisés pour la livraison d'acides nucléiques en raison de leur facilité de production, leur coût abordable, ainsi que le fait que leurs propriétés biologiques peuvent être modulées en jouant sur les paramètres moléculaires des polyélectrolytes qui les composent (Buschmann et al., 2013). La formation de ces nanoparticules se fait spontanément lorsque l'ARNm est mélangé avec un polycation. Cette formation spontanée est principalement due aux fortes attractions électrostatiques entre les polymères cationique et anionique (acides nucléiques) et aussi au gain d'entropie associé à la libération des contre-ions (Buschmann et al., 2013). Parmi les polycations utilisés pour la formation de PEC, le polyéthylèneimine (PEI) est l'un des polymères cationiques les plus largement utilisés (Dominska & Dykxhoorn, 2010; Shim & Kwon, 2009). Le PEI peut être synthétisé sous une forme linéaire (lPEI) ou ramifiée (bPEI) et son poids moléculaire peut être contrôlé (Dominska & Dykxhoorn, 2010). Les PEI linéaires ont démontré une diminution de la toxicité *in vitro* et *in vivo* par rapport à leurs homologues ramifiés (Bonnet, Erbacher, & Bolcato-Bellemin, 2008; Merkel et al., 2011; Owens & Peppas, 2006), ce qui explique leur utilisation fréquente dans la littérature. Bonnet et al., ont montré que l'administration intraveineuse de lPEI encapsulant de l'ARN interférent induit un silencage génique puissant sans augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires ou des transaminases hépatiques (Bonnet et al., 2008). Cependant, les PEI sont généralement associés à une toxicité (Boeckle et al., 2004; de Fougerolles, Vornlocher, Maraganore, & Lieberman, 2007) et à une instabilité colloïdale (Williford et al., 2014) limitant leur utilisation dans les essais cliniques. La cytotoxicité du PEI a été caractérisée comme un processus en deux phases où l'interaction polycation-cellule induit une perte d'intégrité de la membrane cellulaire et l'initiation de la mort cellulaire programmée (Hunter & Moghimi, 2010). Un aperçu des mécanismes moléculaires de la toxicité a révélé l'importance des interactions physiques entre le polycation et les mitochondries menant à la libération de protéines pro-apoptotiques et à l'initiation subséquente de l'apoptose. Une alternative moins toxique serait le chitosane en tant que polycation pour la formation de PEC (Buschmann et al., 2013). Dans le cadre de l'étude présentée dans ce mémoire, les complexes polyélectrolytes (PEC) à base de chitosane et d'acide hyaluronique sont explorés en tant que nanoparticules servant de vecteurs de livraison d'ARNm. Les sections suivantes de ce chapitre détaillent les composantes qui forment les complexes polyélectrolytes développés dans cette étude.

2.2 Le chitosane

2.2.1 Structure et propriétés physicochimiques du chitosane

Le chitosane est un copolymère linéaire composé d'unités de glucosamine (**Figure 2-3; D-unit**) et de N-acetyl-glucosamine (**Figure 2-3; A-unit**), liés par des liaisons glycosidiques β (1 $\rightarrow$ 4). Ce polymère est dérivé de la déacétylation partielle de la chitine, le deuxième polysaccharide le plus abondant sur la planète terre après la cellulose (Buschmann et al., 2013; Younes & Rinaudo, 2015).

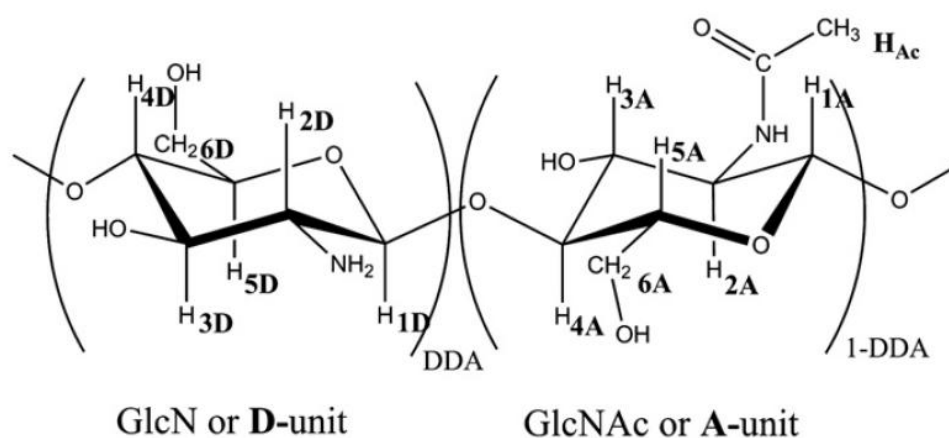


Figure 2-3. Structure chimique du chitosane avec unités désacétylées glucosamine (D-unit) et acétylé N-acetyl glucosamine (A-unit) récurrents aléatoirement et à intervalle variable dépendant du degré de désacétylation du chitosane. Adaptée de (Buschmann et al., 2013) © Elsevier 2018, reproduit avec permission.

Le chitosane est caractérisé par son degré de déacétylation (DDA), sa masse moléculaire, et son indice de polymolécularité (IP) (Buschmann et al., 2013). Le DDA correspond à la fraction molaire des monomères qui sont déacétylés (**Figure 2-3**) et est le paramètre le plus important pour caractériser le chitosane. Effectivement, le DDA permet de connaître la quantité moyenne de groupes amines disponible pour interagir avec les acides nucléiques durant la formation de nanoparticules. De plus, le DDA joue un rôle important dans la solubilité (en régulant la polarité du chitosane) et de la biodégradabilité du polymère, puisque la dégradation nécessite un motif spécifique d'unités glucosamine et N-acetyl-glucosamine (Kean & Thanou, 2010). Le DDA peut être précisément mesuré par RMN-¹H (Lavertu et al., 2003). La chromatographie d'exclusion

stérique permet de séparer les chaînes de chitosane en fonction de leur taille. La combinaison avec un système de diffusion de lumière multi-angles permet de mesurer la masse molaire en nombre (M_n) et la masse molaire moyenne en masse (M_w) (Buschmann et al., 2013).

Le chitosane est un polycation avec un pK_a intrinsèque autour de 6.5-6.7. À des valeurs de pH en dessous du pK_a réel, qui dépend du degré de déacétylation du chitosane, les unités glucosamine (**Figure 2-3**), contenant un groupe amine ionisable, deviennent protonnées. Ceci permet au chitosane d'avoir des interactions électrostatiques avec des polyanions, tels que les différents types d'acides nucléiques (ADNp, ARNi, ARNm, etc) et l'HA. L'interaction électrostatique entre le chitosane et les acides nucléiques résulte en une formation spontanée de nanoparticules de différentes tailles et morphologies dépendant de plusieurs facteurs (ratio molaire des charges, concentration et méthode de mélange, poids moléculaire et densité de charge du chitosane, etc.) (Buschmann et al., 2013; Mao, Sun, & Kissel, 2010). Des propriétés additionnelles du chitosane, telles que sa nature mucoadhésive, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, sa faible toxicité ainsi qu'un coût de production abordable (Buschmann et al., 2013; Muzzarelli, 2010; Onishi & Machida, 1999) favorisent l'utilisation de ce polycation en recherche pour différentes applications thérapeutiques, dont le développement de systèmes d'administrations d'acides nucléiques. L'influence des paramètres moléculaires du chitosane (DDA, M_n , ratio molaire des polyélectrolytes durant le mélange) sur l'efficacité de transfection *in vitro*, ainsi que sur les propriétés des nanoparticules formés (taille, charge de surface) sera détaillée dans la section suivante.

2.2.2 Utilisation du chitosane dans des complexes polyélectrolytes

L'influence des paramètres physicochimiques du chitosane sur l'efficacité de transfection *in vitro* des nanoparticules de CS/ADNp a été étudiée et l'efficacité maximale a été trouvée pour des combinaisons particulières de DDA et de masse molaire (Alameh et al., 2018; Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Thibault et al., 2010). Puisqu'il y a des différences structurales entre l'ADNp et l'ARNi qui affectent la stabilité des colloïdes formés de chitosane et d'acides nucléiques, les paramètres de production optimaux pour maximiser la bioactivité dépendent de l'acide nucléique utilisé. Dans tous les cas, les résultats suggèrent qu'un équilibre délicat entre la condensation de la charge utile dans les particules et la décomplexation intracellulaire est nécessaire pour obtenir une efficacité de transfection satisfaisante.

Des mesures de calorimétrie par titration isothermique ont révélé qu'une augmentation du DDA et du Mn était accompagnée par une augmentation de l'affinité entre les polyélectrolytes (Ma, Lavertu, Winnik, & Buschmann, 2009). Le trafic intracellulaire et la cinétique de décomplexation des nanoparticules ont été mesurés par transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) pour confirmer que les nanoparticules avec une forte affinité de liaison étaient incapables d'échapper à l'endosome et de libérer leur matériel bioactif (Thibault et al., 2010).

Thibault et al. ont démontré qu'une combinaison de DDA élevé et Mn faible résulte en des nanoparticules CS/ADNp qui se désassemblent en même temps qu'ils se libèrent des endosomes (Thibault et al., 2010). Ce phénomène s'explique par l'hypothèse de l'éponge à protons (Varkouhi et al., 2011). En résumé, l'acidification de l'endosome se fait par l'entremise du pompage de protons H^+ , mais le chitosane tamponne le milieu, ce qui fait en sorte qu'une plus grande quantité de H^+ et de Cl^- doit être pompée dans l'endosome pour atteindre un pH donné. Par conséquent la pression osmotique augmente jusqu'à la rupture de l'endosome.

Une diminution importante du Mn et/ou du DDA résulte en une diminution de l'internalisation cellulaire (Thibault et al., 2010). Cette dernière observation est probablement due à un désassemblage prématuré et donc une protection réduite des acides nucléiques dans l'endosome riche en nucléases. En accord avec ce qui précède, Kiang et al. ont montré une corrélation positive entre la réduction du DDA, à un poids moléculaire fixe, et l'efficacité de transfection (Kiang, Wen, Lim, & Leong, 2004).

L'administration de l'ARNi via des systèmes à base de chitosane a démontré un silencage plus efficace lorsque des chitosanes ayant un DDA supérieur à 80% sont utilisés (Alameh et al., 2018; Liu et al., 2007). De plus, l'efficacité de silencage de l'ARNi augmente avec l'augmentation du Mn (Alameh et al., 2018; Bustin et al., 2009; Holzerny et al., 2012; Howard et al., 2006; Ji et al., 2009; Liu et al., 2007; Malmo et al., 2012). Ces observations suggèrent que pour des conditions similaires, les polyplexes CS/ARNi sont moins stables que les polyplexes CS/ADNp, donc l'affinité entre le chitosane et l'ARNi doit être régulé à la hausse comparativement aux systèmes CS/ADNp, pour atteindre l'équilibre désiré entre la stabilité colloïdale et la facilité de décomplexation intracellulaire.

Étant donné que le pKa intrinsèque du chitosane est autour de 6.5-6.7, une diminution de la densité de charge (déprotonation) se produit à un pH plus élevé et devrait diminuer l'affinité de

liaison entre les polyélectrolytes. Plusieurs études ont montré que la livraison optimale de l'ADNp est obtenue entre pH 6.5 et 7.0, l'efficacité diminuant rapidement à un pH plus élevé en raison de la libération de la charge utile (Lavertu et al., 2006; Nimesh et al., 2010; Sato et al., 2001; Strand et al., 2008). Cependant, pour des systèmes de chitosane/ARNi, l'efficacité de transfection *in vitro* maintien des niveaux de silencage élevés dans des conditions de pH allant de 6.5 à 7.4 lorsque du chitosane ayant un DDA élevé est utilisé ($\text{DDA} \geq 92\%$ à Mn fixe) (Alameh et al., 2018). Cette efficacité de silencage élevée indique que les nanoparticules de siRNA sont capables d'inhiber les gènes cibles à pH physiologique, soulignant une différence majeure avec l'ADNp (Lavertu et al., 2006; Nimesh et al., 2010; Sato et al., 2001; Strand et al., 2008).

Le rapport N:P, c'est-à-dire le ratio molaire entre les groupes amines du chitosane (N) et les groupes phosphate de l'acide nucléique (P), représente un paramètre important influençant les propriétés physicochimiques et biologiques des nanoparticules binaires (c.a.d. formées de deux composantes; CS et acide nucléique) (Buschmann et al., 2013; Mao et al., 2010). Ce rapport N:P s'est avéré important pour réguler la stabilité des particules et influencer, selon le DDA, la charge de surface (potentiel- ζ) des nanoparticules (Strand et al., 2008). Donc une augmentation du rapport N:P est nécessaire pour compenser une diminution du poids moléculaire et/ou du DDA (Kiang et al., 2004; Koping-Hoggard et al., 2001). Il a été démontré par fractionnement d'écoulement de champ qu'une fraction significative de polycations des systèmes à base de chitosane préparés à des ratios N :P supérieur à 2, n'est pas lié aux particules (Ma, Buschmann, & Winnik, 2010). De plus, il a été démontré que l'efficacité de transfection *in vitro* est plus importante en transfectant avec des polyplexes préparés à N :P=5:1 comparé à des polyplexes préparés à N :P=2 :1 (Thibault et al., 2011). En contraste avec les systèmes CS/ADNp, la majorité des études menées avec des systèmes CS/ARNi ont utilisé un rapport N:P très élevé ($\text{N:P} \geq 25$) dans leurs formulations pour obtenir une bioactivité importante (Bustin et al., 2009; Holzer et al., 2012; Howard et al., 2006; Ji et al., 2009; Liu et al., 2007; Malmo et al., 2012).

2.3 L'acide Hyaluronique

2.3.1 Structure et propriétés physicochimiques de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane (GAG) anionique non sulfaté largement abondant dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et neuronaux (Collins & Birkinshaw, 2013). Le

fait d'être non sulfaté rend ce polymère unique parmi la famille des GAG. De plus, contrairement aux autres GAG, l'HA est synthétisé dans la membrane plasmique et non pas dans l'appareil de Golgi, et peut-être très grand, avec une masse molaire pouvant atteindre les millions de Da (Collins & Birkinshaw, 2013). Ce polysaccharide linéaire est composé d'unités disaccharides récurrentes d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine (**Figure 2-4**)

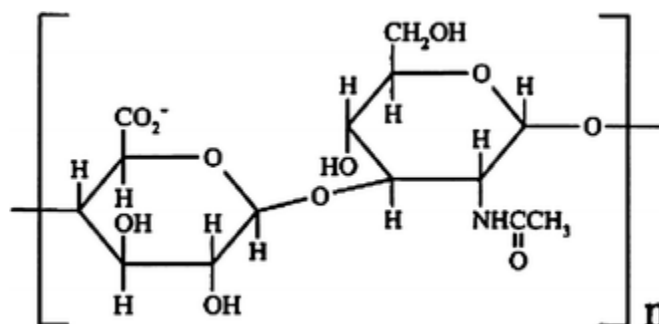


Figure 2-4. Structure chimique du disaccharide récurrent de l'acide hyaluronique. Adapté de (Kogan, Soltes, Stern, & Gemeiner, 2007). © Springer Nature 2018, reproduit avec permission.

Il a été documenté que la sulfatation chimique de l'HA permet de lui conférer des propriétés plus ou moins similaires à l'héparine dépendant du degré de sulfatation (Barbucci, Lamponi, Magnani, & Renier, 1998). Dans le contexte de développement de complexes polyélectrolytes pour la livraison d'ARNm, la sulfatation de l'HA permet de moduler la densité de charge de ce polyanion, ce qui permet d'avoir un contrôle sur le degré de stabilité colloïdale des particules ternaires formées d'HA, de CS et d'ARNm.

2.3.2 Utilisation du HA dans des complexes polyélectrolytes

L'acide hyaluronique (HA) a été décrit comme amplificateur de la bioactivité lorsqu'il est ajouté à des PEC binaires PEI/ADNp et CS/ADNp (Ito, Iida-Tanaka, & Koyama, 2008; Ito et al., 2006; Manna, Bharani, & Patil, 2009). L'amélioration de la performance suite à l'inclusion d'HA dans ces systèmes de livraison pourrait être attribuée à différents mécanismes énoncés dans la littérature. Tout d'abord, il a été observé que l'HA réduit les interactions non spécifiques entre les nanoparticules encapsulant les acides nucléiques, et les protéines sériques (Ito et al., 2006) en même temps d'améliorer l'internalisation des nanoparticules chez les cellules exprimant les récepteurs C44, RHAMM et HARLEC (Luo & Prestwich, 1999; Mok, Park, & Park, 2007).

Deuxièmement, il a été observé que, suite à l'internalisation cellulaire, l'HA s'accumule dans les régions péri-nucléaire des cellules, favorisant l'expression de gènes (Ruponen et al., 2001). Finalement, la présence de HA permet de diminuer la force des interactions entre le chitosane et les acides nucléiques, sans complètement déstabiliser les colloïdes (Ito et al., 2006), facilitant ainsi la libération de l'acide nucléique dans le cytoplasme (Ito et al., 2006). Puisque l'HA a un pKa intrinsèque autour de 3-4 (Menzel & Farr, 1998), il demeure pleinement ionisé dans un milieu physiologique à pH=7.4.

La coexistence du chitosane et de l'acide hyaluronique dans des systèmes de livraison d'acide nucléique est intéressante, car elle combine la faible toxicité et l'effet d'éponge protonique du chitosane, avec les propriétés promotrice de bioactivité de l'HA (Al-Qadi et al., 2013; Almalik et al., 2013; Ito et al., 2006; Luo & Prestwich, 1999; Ruponen et al., 2001), telles que l'internalisation médiée par les récepteurs CD44 qui sont surexprimés chez plusieurs cellules tumorales (Goodison, Urquidi, & Tarin, 1999; Naor, Nedvetzki, Golan, Melnik, & Faitelson, 2002). Les complexes polyélectrolytes binaires formés de CS et d'acide nucléique ont été largement étudiés (Alameh et al., 2018; Buschmann et al., 2013; Haley & Frenkel, 2008; Holzerny et al., 2012; Ji et al., 2009; Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Mao et al., 2010), mais des études portant sur des systèmes ternaires sont limités quand on s'intéresse aux systèmes contenant du chitosane et de l'acide hyaluronique (Al-Qadi et al., 2013; Almalik et al., 2013; Lallana et al., 2017). Présentement, Lallana et al. ont été les seuls à étudier ce type de système pour la livraison d'ARNm. Lallana et al. ont observé que la présence d'HA permet d'augmenter le taux d'internalisation cellulaire chez les cellules surexprimant le récepteur CD44. La relation entre la stabilité des particules et la bioactivité *in vitro* qu'ils ont démontrée est cohérente avec ce qui a été observé pour des systèmes binaires CS/ADNp (Lavertu et al., 2006; Thibault et al., 2010). Bref, les colloïdes formés d'HA-CS/ARNi et HA-CS/ARNm doivent être optimisés afin de permettre la libération intracellulaire de l'acide nucléique tout en maintenant une stabilité suffisante pour protéger le matériel bioactif avant qu'il arrive aux cellules cibles. L'équilibre entre l'affinité des polyélectrolytes et la facilité de décomplexation est clé dans la maximisation de la bioactivité *in vitro*.

2.4 Le tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur composé de deux monomères de glucose (**Figure 2-5**), qui est produit en réponse au stress dans de nombreux organismes (Katyal & Deep, 2014). Cette molécule présente la capacité de stabiliser des lipides et protéines pour la lyophilisation (lyoprotection), d'assurer une fonction de réserve énergétique nette, de participer à l'osmorégulation, à empêcher l'agrégation des protéines β -amyloïdes et prion et d'agir comme cryoprotecteur (Jain & Roy, 2009; Singer & Lindquist, 1998).

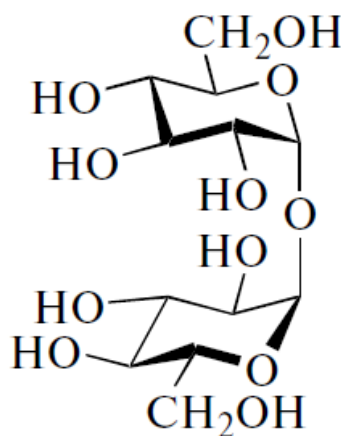


Figure 2-5. Structure chimique du tréhalose. Adapté de (Feofilova, Usov, Mysyakina, & Kochkina, 2014).© Springer Nature 2018, reproduit avec permission

Intuitivement, il est raisonnable de croire que si le tréhalose est efficace pour stabiliser des protéines, il pourrait avoir un effet similaire avec d'autres complexes de macromolécules ionisables, telles que les complexes polyélectrolytes qui sont à l'étude. Plusieurs théories proposées dans la littérature cherchent à expliquer le mécanisme de stabilisation du tréhalose. L'hypothèse de remplacement de l'eau suggère que le tréhalose stabilise une protéine via une interaction directe par des liaisons hydrogène (Carpenter & Crowe, 1989; Crowe, Crowe, & Chapman, 1984). En revanche, l'hypothèse de piégeage de l'eau (Lins, Pereira, & Hunenberger, 2004), qui est une extension de l'hypothèse d'exclusion préférentielle (Xie & Timasheff, 1997), suggère que le tréhalose emprisonne l'eau à l'interface des polymères par la formation de domaines vitreux et préserve ainsi la solvation native des protéines. L'hypothèse de piégeage mécanique suggère que la stabilisation se produit par piégeage des macromolécules dans une

matrice vitreuse de tréhalose (Green & Driggers, 1989). Chacune de ces hypothèses peut expliquer en partie le phénomène observé, mais aucune d'entre elles n'est globalement descriptive dans toutes les gammes de concentration de tréhalose. Par exemple, l'hypothèse de piégeage mécanique ne peut être appliquée que lorsque la concentration de tréhalose est élevée ($\geq 1M$). De plus, des études récentes présentent des contradictions quant au mécanisme d'action du tréhalose (Crowe et al., 1984).

Suite à une expérience effectuée dans notre laboratoire cherchant à optimiser la lyophilisation de PEC avec l'ajout de tréhalose en tant que lyoprotectant, il a été observé que la bioactivité des échantillons réhydratés était améliorée en présence de tréhalose. Il sera intéressant de vérifier si le tréhalose peut interagir avec des complexes polyélectrolytes pour améliorer leur bioactivité, possiblement en affectant la stabilité colloïdale des PEC.

2.5 Caractérisation des nanoparticules

La taille moyenne et la distribution de taille des nanoparticules ont été mesurées par diffusion de lumière dynamique. De plus, pour avoir une idée de la charge de surface des nanoparticules, le potentiel- ζ (Potentiel Zeta) a été mesuré par diffusion de lumière électrophorétique (ELS). Les notions théoriques sur lesquelles ces techniques de caractérisation sont basées sont présentées dans cette section.

2.5.1 Diffusion de lumière dynamique (DLS)

La diffusion de lumière dynamique (DLS) permet de mesurer la taille moyenne hydrodynamique de nanoparticules en solution (Bhattacharjee, 2016). En résumé, un faisceau laser est dirigé à travers la solution colloïdale. Lorsque le laser atteint les nanoparticules, la lumière va diffuser dans toutes les directions. Si la taille des particules est inférieure à $\lambda/10$ (ou λ est la longueur d'onde du faisceau laser), la lumière va diffuser à la même intensité dans toutes les directions (diffusion Rayleigh), mais dans le cas contraire (taille supérieure à $\lambda/10$), l'intensité de la lumière diffusée va dépendre de l'angle de diffusion (Diffusion Mie) (Bhattacharjee, 2016). Un ou plusieurs détecteurs, positionnés à différents angles, collectent les photons de la lumière diffusée (**Figure 2-6**).

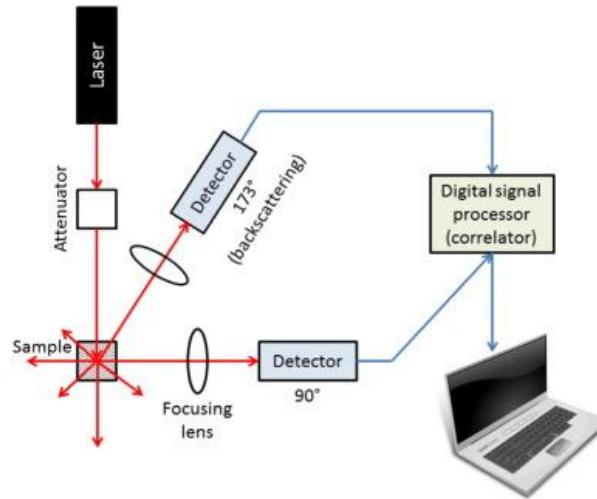


Figure 2-6. Instrumentation pour effectuer des mesures en diffusion de lumière dynamique. Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission

Le mouvement brownien des nanoparticules va provoquer des interférences constructives et destructives, faisant en sorte que l'intensité détectée de la lumière diffusée va fluctuer dans le temps. À partir de la fluctuation de l'intensité lumineuse, la fonction d'autocorrélation du signal est générée par le logiciel. Le temps caractéristique de décroissance de la corrélation permet de déterminer le coefficient de diffusion à l'aide d'une fonction mono-exponentielle indiqué ci-dessous :

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau}$$

où D_t est le coefficient de diffusion, b est une constante dépendante de l'instrument utilisé, τ est le temps caractéristique de décroissance de la corrélation et q est le vecteur de diffusion exprimé par la relation ci-dessous :

$$\left(|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \right)$$

où n_0 est l'indice de réfraction du solvant, λ_0 est la longueur d'onde dans le vide et θ est l'angle de diffusion.

À partir du coefficient de diffusion D_t obtenu, il est possible de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules avec l'équation ci-dessous :

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température en kelvin, η est la viscosité du solvant, et R_H est le rayon hydrodynamique, correspondant au rayon d'une sphère solide hypothétique qui diffuse à la même vitesse que les particules analysées par DLS. Donc il faut s'assurer que les nanoparticules ont une forme sphérique pour avoir une approximation de la taille par DLS qui est réaliste.

2.5.2 Potentiel- ζ et diffusion de lumière électrophorétique (ELS)

En solution, la charge de surface d'une nanoparticule est enrobée par une couche fixe de contre-ions (**Figure 2-7** ; *Stern layer*). En dehors de cette couche fixe se trouve une couche diffuse formée d'ions de la solution. L'ensemble des charges stationnaires (*Stern Layer*) et des charges mobiles diffuses est défini comme la double couche (**Figure 2-7** ; *Electrical double layer*) et cette zone est électriquement neutre dans son ensemble (Kirby & Hasselbrink, 2004). Lorsqu'une différence de potentiel est introduite dans la solution colloïdale, toutes les particules chargées sont attirées vers l'électrode de polarité opposée accompagnée de la couche fixe de contre-ions (*Stern layer*) et d'une partie de la couche diffuse d'ions. Le potentiel- ζ est la mesure du potentiel électrique au plan de cisaillement (**Figure 2-7**, *slipping plane*) (Kirby & Hasselbrink, 2004) correspondant à la frontière entre la phase de charges mobiles et stationnaires et dépend de non seulement la charge de surface réelle de la particule, mais aussi de la force ionique du milieu de dispersion (Doane, Chuang, Hill, & Burda, 2012). Il s'agit d'un bon indicateur de la répulsion/attraction électrostatique entre les nanoparticules dispersées dans un milieu aqueux. Pour cette raison, le potentiel- ζ pourrait être décrit comme l'un des paramètres fondamentaux importants affectant la stabilité des nanoparticules.

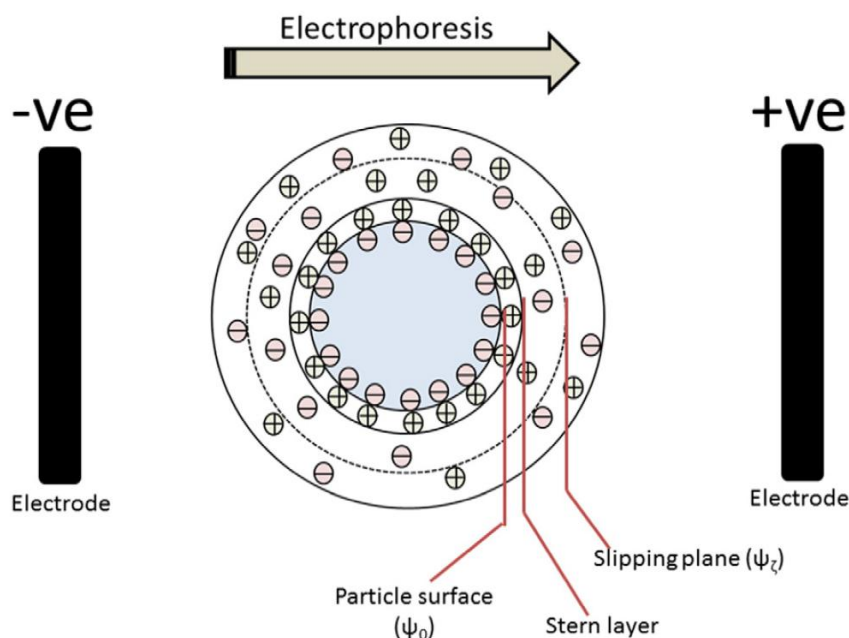


Figure 2-7. Structure des couches d'ions d'une nanoparticule en suspension dans un milieu de dispersion soumis à un champ électrique. Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission

La mesure du potentiel- ζ ne peut pas se faire directement, alors il est dérivé de la mobilité électrophorétique des particules, mesurée par diffusion de lumière électrophorétique (ELS). Cependant, l'interprétation de la mobilité électrophorétique des colloïdes, en particulier lorsqu'il s'agit de PEC ou de nanoparticules solides revêtues de ligands, peut être complexe (Doane et al., 2012). Ceci étant dit, dans le cadre de cette étude, la mesure du potentiel- ζ , est effectuée à titre indicatif afin de déterminer si les particules préparées ont une charge nette positive ou négative indiquant un certain degré de stabilisation par répulsion électrostatique. De plus, il s'agit d'une bonne façon de confirmer la stœchiométrie des charges entre les polyélectrolytes formant les nanoparticules. Il est attendu d'observer que les nanoparticules préparées avec un excès de charge positive ont une charge nette positive, et que l'inverse est observé lorsque des particules sont préparées avec un excès de charges négatives.

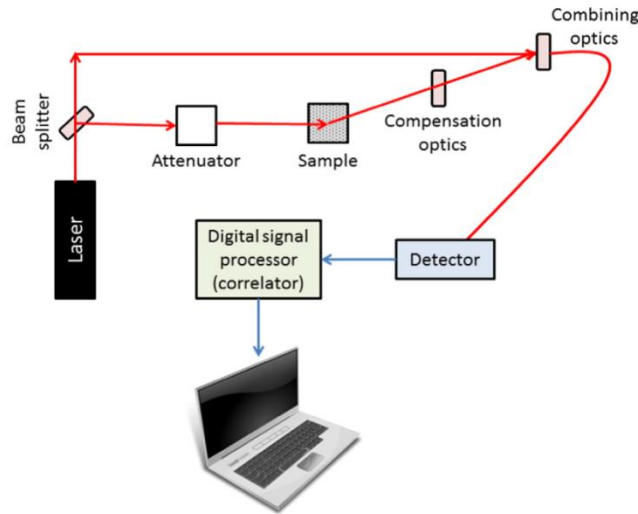


Figure 2-8. Instrumentation pour effectuer des mesures en diffusion de lumière électrophorétique (ELS). Adapté de (Bhattacharjee, 2016). © Elsevier 2018, reproduit avec permission

La **Figure 2-8** illustre le processus de la diffusion de lumière électrophorétique utilisé. En résumé, un faisceau laser est divisé en faisceaux de référence et d'excitation. Le faisceau d'excitation est dirigé à travers l'échantillon tandis qu'un champ électrique $\vec{E}$ est appliqué pour induire l'électrophorèse des nanoparticules tel qu'illustré dans la **Figure 2-7** (Doane et al., 2012). Lors de la recombinaison des faisceaux diffusés et de référence, une différence de fréquence est mesurée par le détecteur ELS pour fournir la vitesse de dérive électrophorétique des particules $\vec{v}$ (Doane et al., 2012). La mobilité électrophorétique μ est ensuite déterminée par l'équation suivante : $\vec{v} = \mu \vec{E}$

Avec la mobilité électrophorétique, il est possible de déterminer le potentiel- ζ à l'aide de la formule de Smoluchowski ou Hückel. La sélection de l'équation à utiliser dépend du produit du paramètre de Debye κ et le rayon a des nanoparticules (Doane et al., 2012). Dans les équations ci-dessous, ϵ est la constante diélectrique du solvant, ϵ_0 est la permittivité du vide et η est la viscosité du solvant.

$$\text{Smoluchowski } (\kappa a \gg 1); \mu = \epsilon \epsilon_0 \eta^{-1} \zeta$$

$$\text{Hückel } (\kappa a \ll 1); \mu = \frac{2}{3} \epsilon \epsilon_0 \eta^{-1} \zeta$$

**CHAPITRE 3 ARTICLE 1: IN VITRO EFFICACY OF
CHITOSAN/HYALURONIC ACID BASED MRNA DELIVERY
SYSTEMS: INFLUENCE OF COMPOSITION, HYALURONIC
ACID SULFATION DEGREE, MOLECULAR WEIGHT AND
STRUCTURAL PARAMETERS**

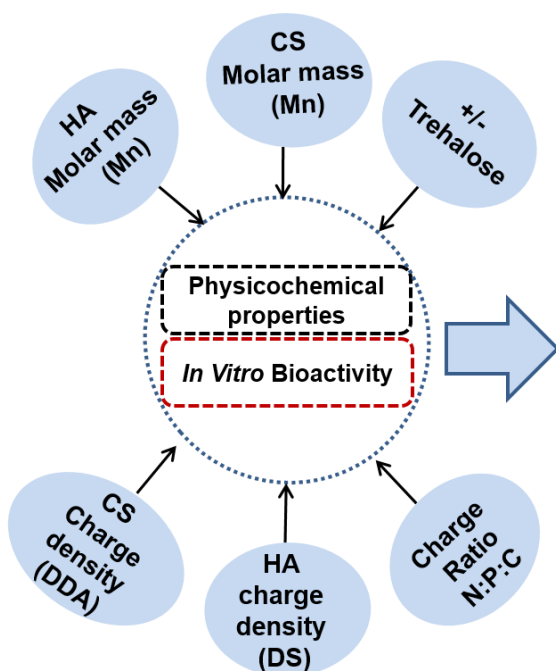
Ousamah Younoss Soliman², Mohamad Alameh², Nicolas Tran-Khanh², Gregory De Cresenzo^{1,2},
Michael D. Buschmann[†] and Marc Lavertu^{1,2**}.

¹ Polytechnique Montreal, Department of Chemical engineering, Montreal, QC, Canada. ²
Polytechnique Montreal, Institute of Biomedical engineering, Montreal, QC, Canada. [†]George
Mason University, Department of Bioengineering, Volgenau School of Engineering, Fairfax,
USA

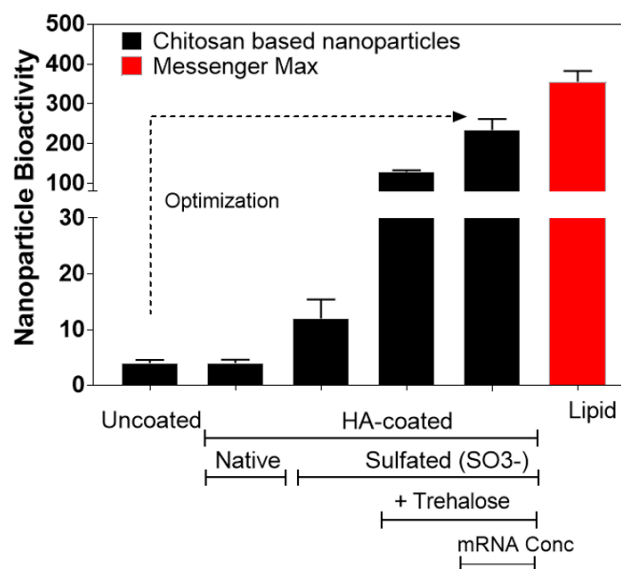
Soumis à Biomacromolecules (2018)

Graphical Abstract:

Screening of chitosan and HA parameters



Improved (~10-12 fold) *in vitro* bioactivity



Abstract:

For understanding design principles and optimizing parameters for efficient delivery of messenger RNA (mRNA), a library of pharmaceutical grade chitosans (CS) and hyaluronic acids (HA) (native versus sulfated) was used to produce nanoparticles with different degrees of deacetylation (DDA), polymer length (Mn), degrees of sulfation (DS), and amine to phosphate to carboxyl (+sulfate) ratio (N:P:C), in the presence/absence of kosmotropic agent and tested *in vitro* at different pHs. Particles were characterized for their size and ζ -potential and correlated with bioactivity. Polymer length and charge densities (DDA, DS) of both HA and CS had a direct influence on *in vitro* bioactivity through modulation of avidity. N:P:C ratio, trehalose, mixing concentration and nucleic acid dose play important roles in improving bioactivity with optimized formulations reaching ~ 60-65% transfection efficiency relative to commercially available lipid control with no apparent toxicity.

3.1 Introduction

Chitosan is a family of biocompatible cationic polymers that can be precisely tuned for specific number average molecular weight (Mn) and degree of deacetylation (DDA), using chemical and/or enzymatic processes ¹. Spontaneous formation of binary polyelectrolyte complexes, or nanoparticles (NPs), occurs during mixing of polyanionic molecules such as nucleic acids (NA) and cationic chitosan (CS) through a process driven by electrostatic interactions and entropy gain ¹. Transfection efficiency (TE) with plasmid DNA and siRNA was previously shown to depend on a fine balance between nanoparticle complexation (stability) and decomplexation (instability) ²⁻⁶ with parameters such as DDA, Mn, amine to phosphate ratio (N:P), pH and serum content strongly modulating polymer affinity, or avidity ¹⁻⁹ (avidity being defined as cumulative strength of multiple affinities). Despite several reports demonstrating *in vitro*^{3, 5-14} and *in vivo*^{3, 15-17} efficacy, colloidal instability and blood-polymer interactions ¹⁸ limit nanoparticle dosing ³. Recent studies demonstrated different design parameters or requirements for long double-stranded and flexible NAs (i.e. plasmid) ⁵ versus short and stiff molecules (i.e. siRNA) ³ highlighting the need to tailor design based on the nature of the delivery cargo. Improvement of colloidal stability and hemocompatibility can be achieved through chemical modification of the polymer, nanoparticle surface decoration and/or via inclusion of other polyelectrolytes to form ternary structures/complexes ^{1, 16, 19-21}.

Hyaluronic acid (HA), a biocompatible glycosaminoglycan (GAG), has been previously shown to electrostatically coat CS and improve nanoparticle hemocompatibility ¹⁴. In addition, HA could improve internalization via interactions with the CD44 and RHAMM receptors ^{19, 22} in multiple cell lines and tumors²³ and is an attractive option for nanoparticle decoration. In contrast to other GAGs, HA is not sulfated (SO₃⁻) and has a relatively low charge density (~ 1 - charge/dimer) potentially limiting binding affinity to chitosan resulting in premature decomplexation/reduced bioactivity.

Here the effect of DDA, polymer length (Mn), mixing ratio (N:P) and pH was systematically examined on a library of accurately characterized chitosans and correlated with physicochemical characteristics (size, polydispersity index, and ζ -potential) of nanoparticles. Moreover, *in vitro* bioactivity was also investigated to understand design parameters driving efficient *in vitro* delivery of messenger RNA (mRNA); a class of nucleic acid with promising potential for

therapeutic use. Efficient formulations (uncoated) were selected and the influence of polymer length, HA degree of sulfation (DS), and stoichiometry (amino to carboxylic acid to phosphate ratio; or N:P:C ratio) was studied for the first time to correlate physicochemical parameters with *in vitro* bioactivity, toxicity. In addition, trehalose, a disaccharide, with protective stabilising properties²⁴ was investigated for improved nanoparticle stability and bioactivity. In this report, we show that coating with specific HAs in the presence of trehalose improved transfection efficiency revealed by luciferase expression ~ 16 fold compared to uncoated formulations reaching ~50-60% of commercially available lipid controls with no apparent toxicity.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Materials

5meC ψ U modified mRNA encoding the firefly luciferase (FLuc) (Cat#L-6107-1000) was purchased from Trilink Biotechnologies. Raw chitosan (~180kDa, ~80%DDA) was obtained from Marinard (Rivière-au-Renard, QC, Canada). Hyaluronic acids ranging in molecular weight (10kDa – 150kDa) and degree of sulfation (DS of 0.5 to 2 sulfates/dimer) were provided by HTL Biotechnology (Lots# FP-RD009-27, FP-RD009-33, FP-RD009-34, FP-RD009-35; Javene, France). High (866kDa, Cat#HA1M-1) and low molecular weight (10 kDa, Cat #HA10K-5) nonsulfated HAs were purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada). HEPES free RPMI-1640 (Cat# 350-002-CL from Wisent (Saint-Bruno, QC, Canada). MOPS buffer (Cat #M-1254) was purchased from VWR. Trehalose dihydrate (Cat #T-9531), and endotoxin free hydrochloric acid 0.1M (Cat #2104), sodium hydroxide (Cat #71690) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Nunc™ F96 MicroWell™ culture plates (Cat # 136101), alamarBlue cell viability reagent (Cat # DAL1025), DPBS (Cat #14190-144), Sodium Pyruvate 100mM (Cat# 11360-070), RNase free water (Cat #B-003000-WB-100), RPMI-1640 with HEPES, Opti-MEM Reduced serum medium (Cat# 31985-062), Fetal bovine serum (FBS, Cat #26140), Lipofectamine Messenger MAX (Cat# LMRNA001), GlutaMAX™ 100X (Cat# 35050-061) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Burlington, ON, Canada).

3.2.2 Preparation and characterization of depolymerized chitosan

Raw chitosan was heterogeneously deacetylated using concentrated sodium hydroxide to reach specific degrees of deacetylation (DDA: 80%, 92%, and 98%) followed by nitrous acid depolymerization to achieve specific number average molecular weight targets (M_n) of 5, 10, 40 and 180 kDa. Chitosan number and weight average molecular weights (M_n and M_w) were determined by Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle static Light Scattering (SEC-MALS) using a Shimadzu LC20AD isocratic pump coupled with a Dawn HELEOS OO multi-angle laser light scattering detector (Wyatt Technologies co, Santa Barbara, CA), and Optilab rEX interferometric refractometer and two Tosoh TSKgel (G6000PWxl-CP and G5000PWxl-CP; Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA). The degree of deacetylation was determined

by ^1H NMR ⁵. Elution of chitosans during characterization were conducted as previously described ³.

Table 3-1. Characterization of Chitosans and Hyaluronic Acids Tested in This Study. Different chitosans and hyaluronic acids denoted according to their chemical composition using the nomenclature [CS:DDA-Mn] and [HA:DS-Mn] respectively are listed in the first column of the table. The degree of deacetylation (DDA) was determined by ^1H NMR. The number and weight average molecular weight (Mn and Mw) were determined by SEC-MALS. The polydispersity index (Pdl) was calculated as M_w/M_n . The degree of sulfation (DS) and Mn of HAs were provided by the manufacturer on the certificates of characterization.

Chitosan & Hyaluronic acid	DDA(%)	Mn (kDa)	Pdl	DS (sulfates/dimer)
CS:80-5	80.2	4.3	1.67	-
CS:80-10	82.9	10.1	1.60	-
CS:80-40	82.5	38.4	1.39	-
CS:92-5	91.7	4.30	1.51	-
CS:92-10	92.3	11.3	1.49	-
CS:92-20	92.0	24.0	1.55	-
CS:92-180	91.9	180.0	1.86	-
CS:98-5	98.0	5.2	1.37	-
CS:98-10	98.1	10.1	1.59	-
CS:98-40	98.8	34.8	1.32	-
HA:0S-10	-	10.0	NA	0.0
HA:0S-866	-	866.0	NA	0.0
HA:0.9S-10	-	11.0	NA	0.9
HA:1.4S-10	-	12.0	NA	1.4
HA:1S-150	-	154.0	NA	1.0

3.2.3 Preparation of CS, HA, and mRNA stock solutions

5meC- ψ U modified FLuc stock solution was purchased in RNase free water at 1mg/mL and characterized for concentration and purity by UV spectrophotometry (A_{260} , A_{280} , and $A_{260/280}$ nm).

Aliquots of the mRNA stock were stored at -80°C until use. Chitosan and hyaluronic acid stock solutions were prepared at 5 and 2 mg/mL respectively by dissolving CS in hydrochloric acid (HCl) at a glucosamine to HCl molar ratio of 1:1 and HA in RNase free water. All solutions, except mRNA, were dissolved overnight on a rotary mixer at room temperature, sterile filtered using 0.22 μm PVDF membranes and stored at 4°C until use (2-weeks maximum storage).

3.2.4 Preparation of Nanoparticles by Manual Mixing

Chitosans and hyaluronic acid stock solutions were diluted to specific molar glucosamine (N) to mRNA phosphate (P) to carboxyl (C) ratio (N:P:C) of 5:1:0, 5:1:1 and 5:1:7 using sterile and nuclease-free water; note that C denotes the carboxyl or the carboxyl + sulfate for the case when HA is sulfated. Before complexation, FLuc mRNA was diluted to a working concentration of 0.15 mg/mL. Nanoparticles were formed by simple electrostatic complexation following manual addition of specific chitosans (different Mn and DDA) to FLuc mRNA at a 1:1 ratio (v/v), allowed to rest for 10 min, and mixed with specific hyaluronic acids (HAs with different Mn and DS) at specific P:C ratios (*i.e.* 1:1 or 1:7) at a volumetric ratio of 2:1 to reach a final nucleic acid concentration in particles of 0.05 mg/mL; nanoparticles with an N:P:C ratio of 5:1:0 (uncoated) were prepared as described above with water replacing HA. For trehalose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, Mw 342.296 g/mol), all stock solutions (*i.e.* CS, HA, mRNA) were diluted to a final concentration of 0, 5 and 10 % (w/w) and nanoparticles formed as described above. In all experiments, the final volume never exceeded 250 μL , and chitosan was pipetted into mRNA. Nanoparticles were kept at room temperature for 20-30 min before further use.

Lipofectamine™ MessengerMax™-FLuc mRNA nanoparticles were prepared by diluting the FLuc mRNA stock solution to 0.03 mg/mL in Opti-MEM serum-free media and complexed to lipid component as per manufacturer recommendation.

3.2.5 Determination of Nanoparticle Size (Z-average), Polydispersity, and Surface Charge

The hydrodynamic diameter (Z-average size) and surface charge (ζ -potential) were measured at 25°C by dynamic light scattering (DLS) and laser Doppler velocimetry using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with a solid-state HeNe 633 nm laser at a scattering angle of 173° . Samples were diluted 1:8 and 1:16 using sterile RNase free

water before determination of size/PDI and ζ -potential respectively. ζ -potential values were computed by the Malvern software from the measured U_E by application of the Henry equation:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa a)}{3\eta}$$

where ζ is the zeta-potential, ε is the dielectric constant of dispersant (water), η is

the viscosity, and $F(\kappa a)$ is the Henry function. Each measurement was performed in triplicate run with fifteen measurements / run ($N = 3$, $n = 45$).

3.2.6 Cell culture and transfection

The EGFP⁺ H1299 cell line (human lung carcinoma) was provided by Prof. Jorgen Kjems (Aarhus University, Denmark) and used for *in vitro* transfection. Cells were cultured in HEPES buffered RPMI-1640 media supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% GlutaMAX, and 500 µg/mL of G418 antibiotic at 37 °C in a 5% CO₂ environment.

For assessment of transfection efficiency (i.e. Luc assay) and toxicity (alamarBlue assay), cells were seeded in white ThermoFisher Scientific™ Nunc™ F96 MicroWell™ culture plates at a density of 3,750 cells/well to reach ~75-80% confluence on the day of transfection (48 hours later); qualitative (visual) assessment of confluence was performed in parallel in a clear Costar 96-well plate (Corning Inc., Cat#3595) whereas quantitative assessment of EGFP (EGFP quantification; λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 530 nm) in the white plate was performed using a TECAN infinite F500 micro-plate system (Tecan Systems, Mannedorf, Switzerland).

Prior to transfection, the culture medium was replaced with MOPS supplemented (20 mM) RPMI-1640 (HEPES^{-/-}) buffered at 6.5 or 7.3 in the presence of 10% serum. Nanoparticles were prepared as described above, and a specific volume added to cells to reach the target mRNA dose/well; for the dose-response experiment nanoparticle volume depends on both mixing concentration and final dose. Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ environment for 24 hours and transfection media (HEPES^{-/-}, MOPS supplemented, pH buffered RPMI-1640) replaced with culture media (RPMI-1640) for an additional 24 hours before assessment of resofurin (alamarBlue) reduction (toxicity), and luciferase activity (transfection efficiency).

3.2.7 Assessment of Nanoparticle Toxicity Using the AlamarBlue Assay.

The effect of nanoparticles on metabolic activity (toxicity) was measured using the alamarBlue assay 48 h post-transfection, by replacing media over cells with 200 μ L of complete RPMI-1640 medium supplemented with 10% alamarBlue reagent. Fluorescence was measured at 612 nm using a TECAN infinite F500 micro-plate system (Tecan Systems, Mannedorf, Switzerland) 1 h after the addition of the assay reagent. Metabolic activity or percentage viability of the cells was calculated as mean Fluorescence Intensity (FI) relative to untransfected cells (*Viability (%)* =

$$\frac{\text{Mean FI (treated)}}{\text{Mean FI (untreated)}} \times 100).$$

3.2.8 Assessment of Nanoparticle Bioactivity (Luciferase expression).

For the assessment of luciferase expression (activity), cells were washed twice 48 h post transfection with 200 μ L of pre-warmed $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS, and EGFP measured ($\lambda_{\text{em}} = 535$ nm) in 50 μ L PBS using the multi-readings/well function on a TECAN infinite F-500 microplate reader (Tecan Systems, Mannedorf, Switzerland). Cells were then lysed for 10 minutes by adding an equal volume (50 μ L) of the lysis-luciferin mix (40 mM tricine, 2.14 mM magnesium carbonate hydroxide pentahydrate, 5.34 mM magnesium sulfate, 0.2 mM EDTA, 66.6 mM DTT, 1.08 mM coenzyme A, 0.94 mM D-luciferin, 1.06 mM ATP, 2% w/v Brij-58, 200 mM trizma acetate, 40 mM Mg-acetate, 4 mM EGTA) to the PBS pre-filled wells, and luminescence measured using the same micro-plate reader. Luciferase activity was expressed as relative luminescence units (RLU) following normalization against the average EGFP signal (fluorescence) from the same well and calculated as $RLU = \frac{\text{Total Luminescence}}{\text{average Fluorescence for the same well}}$.

EGFP signal was also used as a quality control procedure to verify seeding and viability before normalizing luciferase activity and photomultiplier tube (PMT) gain was set constant for all experiments and plates for comparative results.

3.2.9 Hyaluronic Acid Competition

For the hyaluronic acid competition experiments, cells were pre-incubated for 30 min before transfection with an HA (10 kDa, 0S) concentration of 0.031 and 0.22 mg/mL for particles prepared at 5:1:1 and 5:1:7 respectively; *equivalent to ~30-fold concentration found in the nanoparticles and previously demonstrated to block the HA receptor CD44*¹⁹. Transfection was

performed as described above by directly adding nanoparticles to pretreated wells and luciferase activity measured 48 h post-transfection.

3.2.10 Statistical analysis

Data were collected and expressed as average $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis and graphing were conducted using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) software package. Unless otherwise stated, the general linear model, and one/two-factor ANOVA were performed on collected data with Dunnet and Tukey test used for multiple comparisons.

3.3 Results

3.3.1 Chitosan-mRNA nanoparticles bioactivity is similar to chitosan-plasmid nanoparticles, requiring a fine balance between DDA and Mn and slightly acidic pH.

A library of chitosans was produced, accurately characterized (**Table 3-1**) and screened to understand the influence of molecular parameters (i.e. DDA, Mn and N:P ratio) on physicochemical properties (size and ζ -potential) and *in vitro* mRNA expression efficiency. HA addition to nanoparticles was then performed followed by assessing the influence of nanoparticle parameters on bioactivity. As illustrated in **Figure 3-1**, nanoparticle size and polydispersity measured in water were between 80-120 nm and 0.18-0.22 respectively and were not influenced by an increase in DDA, Mn and N:P ratio except for the CS:92-180 formulation that showed reproducible aggregation at high N:P ratio. In contrast to size, surface ζ -potential initially increased with an increase of N:P ratio from 2 to 5 and plateaued above N:P 5 at around 20-25 mV (**Figure 3-1**). Given that these nanoparticles showed colloidal stability in water and had acceptable size, PDIs and positively charged ζ -potential, *in vitro* bioactivity was assessed in the EGFP⁺ H1299 cell line at different pH. As shown in **Figure 3-2**, luciferase activity, an indirect measure of luciferase expression, increased with an increase in N:P ratio in slightly acidic pH conditions. Increasing pH from 6.5 to 7.3 decreased luciferase expression for all formulations tested (**Figure 3-2**). *In vitro* bioactivity showed that transfection occurs at low Mn values of 5 and 10 kDa for intermediate to high DDA formulations reminiscent of requirements established for

plasmid DNA^{5-6, 8, 25-26}. Nanoparticle bioactivity increased significantly with the increase of N:P ratio from 2 to 5 and to a lesser and statistically insignificant, extent when N:P ratio was increased from 5 to 20.

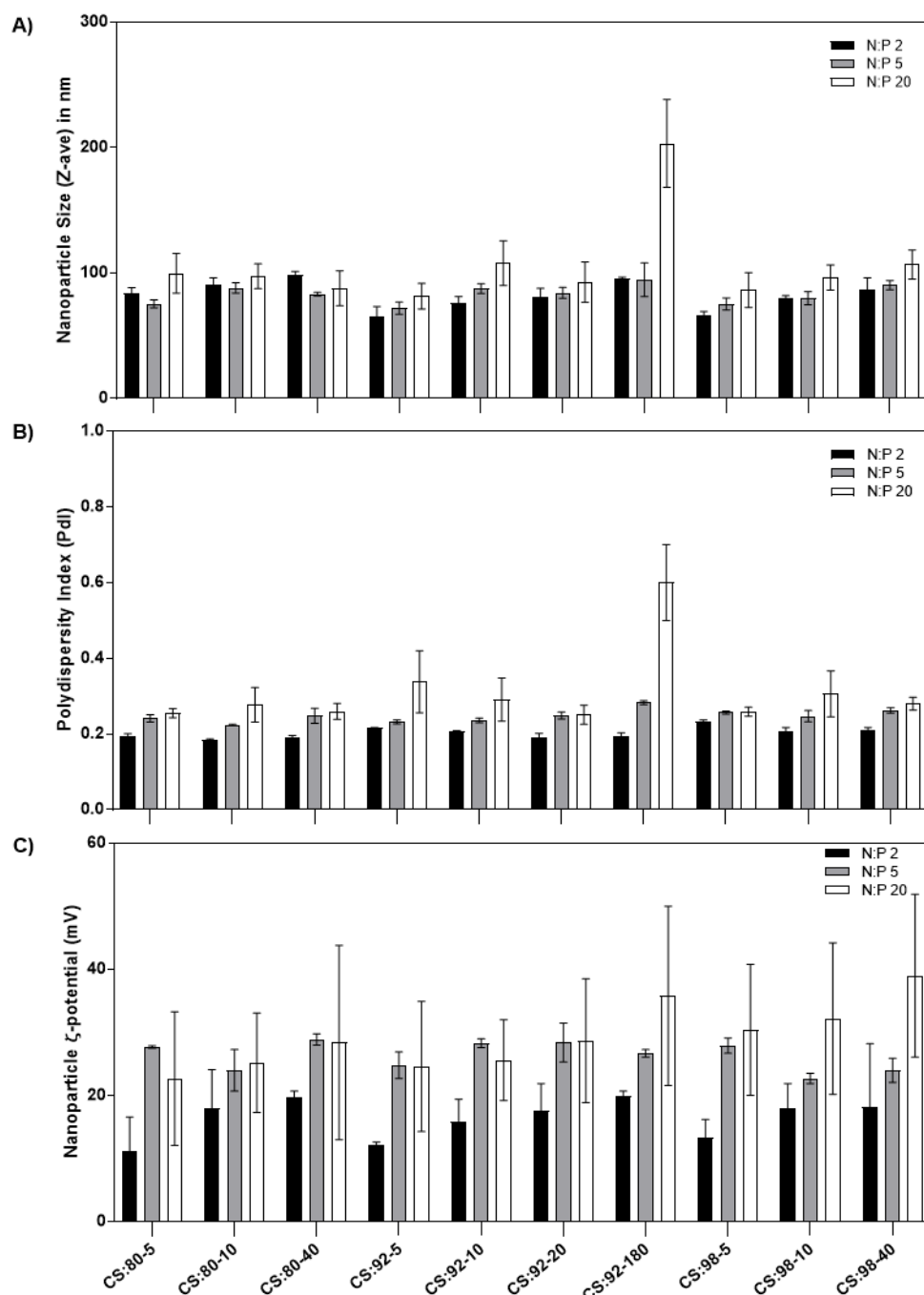


Figure 3-1 Effect of DDA, Mn, and amine to phosphate ratio (N:P) on nanoparticle size, polydispersity index, and ζ -potential Nanoparticles were prepared in water and physicochemical parameters measured using dynamic light scattering. **A)** Nanoparticle size (Z-average in nm), **B)**

Nanoparticle polydispersity, **C**) Nanoparticle ζ -potential in mV. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6).

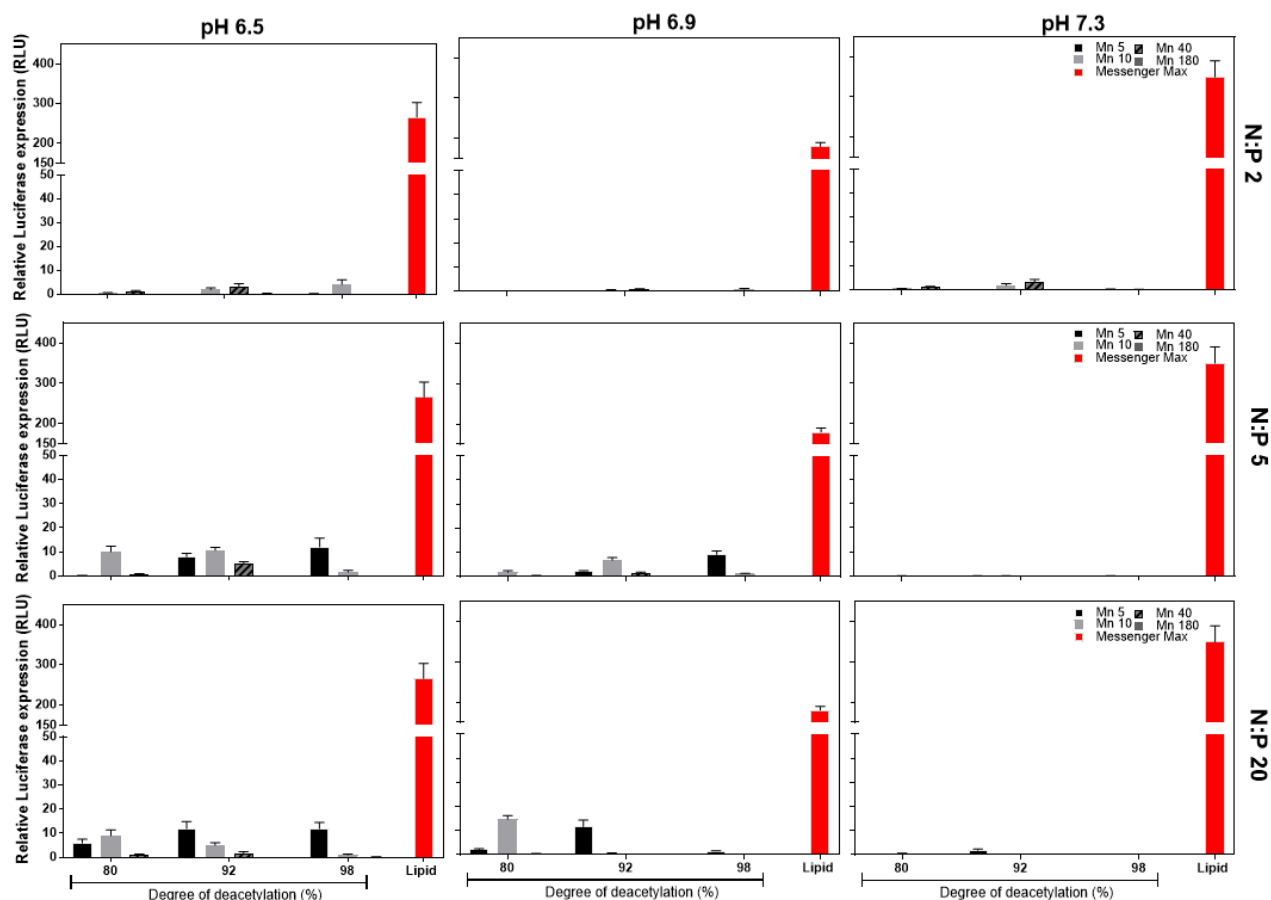


Figure 3-2. Effect of DDA, Mn, amine to phosphate ratio (N:P) and pH on nanoparticles *in vitro* bioactivity in presence of 10 % FBS. Nanoparticles were formed in water following a 1:1 (v/v) mixing ratio at an FLuc mRNA concentration of 0.1 mg/mL. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at a final mLuc dose of 150ng/well. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6). Luciferase expression was normalized to mean EGFP expression. The media pH was adjusted to the specific values in the caption (i.e. 6.5, 6.9 and 7.3) by buffering the RPMI-1640 media with MOPS.

3.3.2 HA coating influences nanoparticle size, surface charge and improves bioactivity.

Based on the above results from *in vitro* luciferase expression and nanoparticle physicochemical properties (**Figure 3-1** and **Figure 3-2**), four formulations with low Mn/intermediate-to-high DDA (viz. CS:80-10, CS:92-10, CS92-5, or CS98-5) were selected for further characterization during

screening of a pharmaceutical grade hyaluronic acid (HA) library (**Table 3-1**). Nanoparticles were prepared at N:P 5 and coated with different HAs (sulfated vs non sulfated at different Mn) at either a P:C ratio of 1:1 (N:P:C 5:1:1) or 1:7 (N:P:C 5:1:7) to study and compare the effect of molar excess of HA on particle physicochemical characteristics and bioactivity.

As illustrated in **Figure 3-3 A**, uncoated chitosans (controls) showed a slight decrease (~ 10 -15 nm) in size with decreasing molecular weight (Mn 10 to 5 kDa) and increasing DDA (80 to 98%). In contrast, the polydispersity index showed an inverse relationship (**Figure 3-3 B**). HA coating affected nanoparticle size, polydispersity and ζ -potential depending on Mn, DS and P:C ratio tested. Nanoparticle surface charge significantly decreased with increasing P:C ratio and reached negative values ~ -25 -35 mV (**Figure 3-3 C**). In contrast, and as expected from the positive to negative mixing charge ratio (stoichiometry), particles prepared at an N:P:C of 5:1:1 remained positive due to an incomplete HA coating of the nanoparticle prepared in excess chitosan (N:P 5). For low molecular weight HA (10 kDa), nanoparticle ζ -potential did not significantly decrease with increasing degrees of sulfation (i.e. 0 to 1.4 S). Interestingly, and counter-intuitively, the greatest decrease in ζ -potential (~ -60 mV) was observed at higher Mn (150 kDa). In general, nanoparticle size increased with either the increase in hyaluronic acid Mn or with the absence of sulfate groups (0S) (**Figure 3-3, A**). Intriguingly, a two-fold size increase was observed with either unsulfated (0S) or intermediately sulfated (0.9-1S) HAs irrespective of the Mn, and only when prepared at a P:C of 1:1. The polydispersity of most HA coated formulations ranged between 0.15-0.22 indicating homogenous nanoparticles and were comparable to uncoated controls (**Figure 3-3, B**). Severe aggregation and increased polydispersity (~ 0.35 -0.4) was observed for formulations coated with high Mn HAs and prepared at net negative surface charge or P:C of 7. It is noteworthy to mention that visual aggregates were observed with the 866 kDa HA upon formation of nanoparticles and could not be accounted for in the DLS measurement consequently underestimating the real polydispersity index (**Figure 3-3, B right side**).

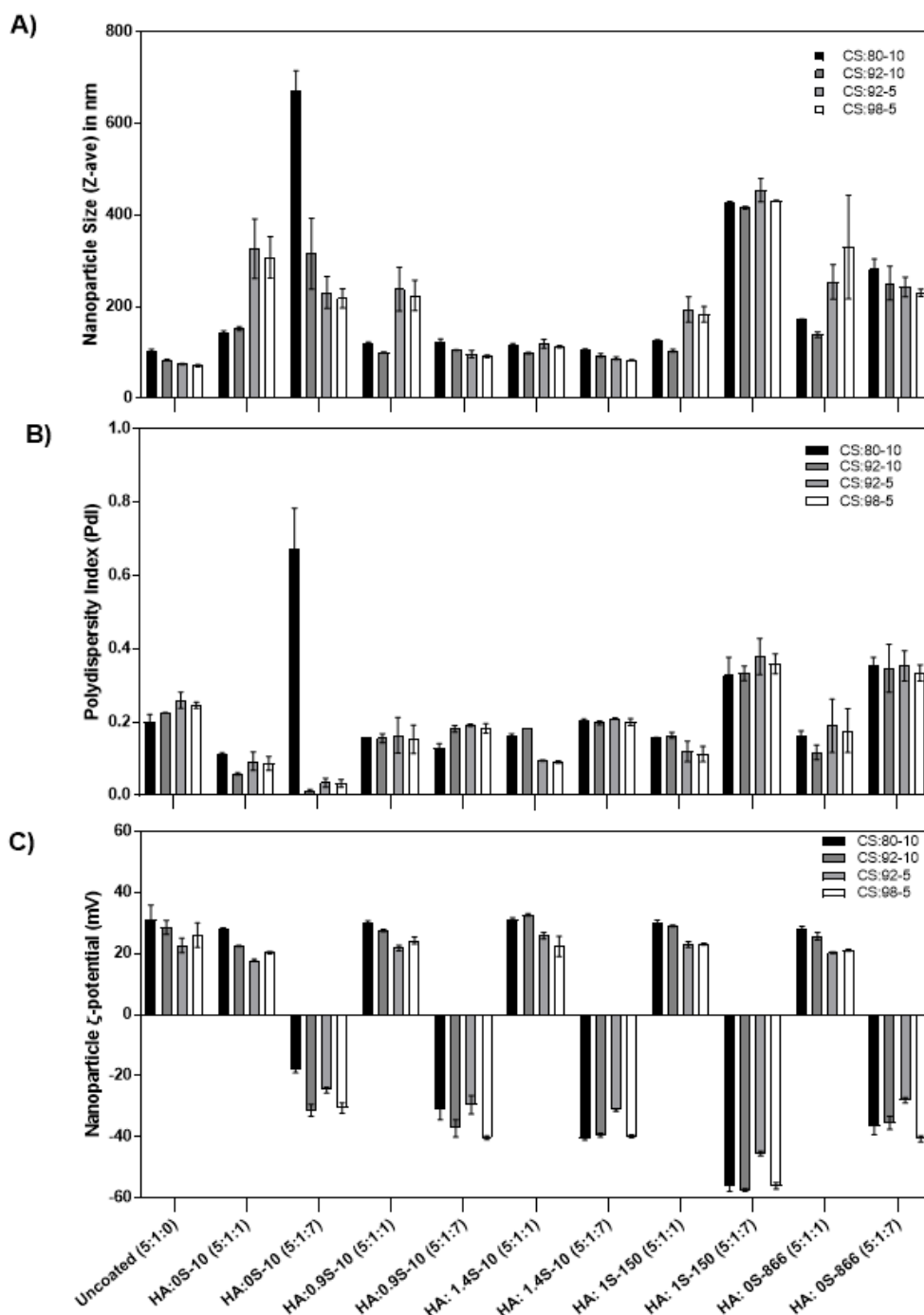


Figure 3-3 Effect of chitosan and hyaluronic acid parameters on nanoparticle size, polydispersity and ζ -potential. Effect of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and hyaluronic acid molecular weight, degree of sulfation and phosphate to carboxyl molar ratio on **A)** nanoparticle size, **B)** nanoparticle polydispersity and **C)** nanoparticle ζ -potential. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment (N = 3, n = 6).

Next, we investigated the effect of the different HA parameters (i.e. Mn, DS, and P:C ratios) on *in vitro* bioactivity by measuring the normalized luciferase expression for each condition tested. In general, a slight increase in luciferase expression was observed with coated nanoparticles prepared at a P:C of 1:1 using low Mn sulfated HAs (**Figure 3-4**). The increase was statistically significant, with an observed 2-fold increase when the degree of sulfation increased from 0 to 1.4 per HA dimer. In contrast to the positively charged and coated NPs (N:P:C 5:1:1), negatively charged particles (N:P:C 5:1:7) showed a small decrease in luciferase activity *versus* both coated (+ ζ -potential) and uncoated (+ ζ -potential) nanoparticles. The observed decrease in transfection efficiency (TE) with particles prepared at N:P:C of 5:1:7 (negative particles) could be explained by limited electrostatic interaction with cell membranes due to electro repulsive forces between the nanoparticles (negative) and cell membranes (negative). Increasing the molecular weight of hyaluronic acid obliterated transfection efficiency (**Figure 3-4**) and, could be explained by the simultaneous increase in size/polydispersity and the appearance of visual aggregates for specific formulations (**Figure 3-3**, see text above).

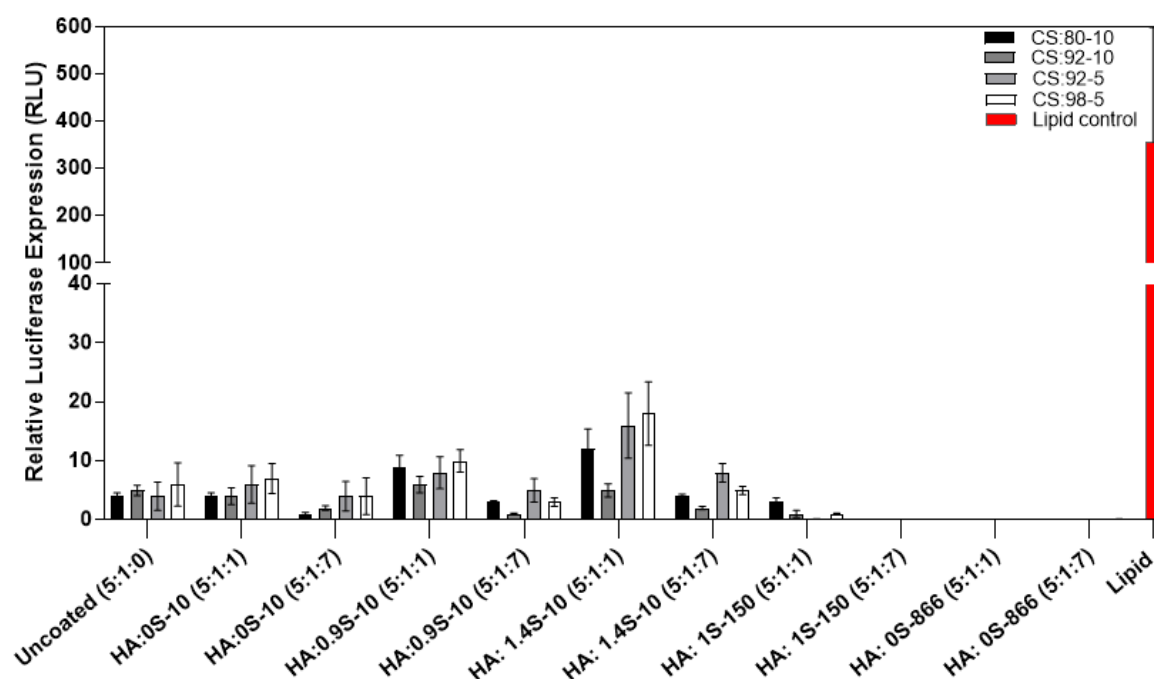


Figure 3-4. Effect of HA degree of sulfation, molecular weight, and P:C ratio on *in vitro* bioactivity.

Nanoparticles were formed in water using a two-step methodology where chitosan and mRNA (0.15 mg/mL) were manually mixed at 1:1 (v/v) ratio, incubated for 10 min and coated with different hyaluronic acids (DS, Mn) at either P:C 1 (positive particles) or 7 (negative particles). EGFP⁺ H1299 cells were

transfected in the presence of 10% FBS, **pH 6.5**, at a final mRNA dose of 150 ng/well. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6). The media pH was adjusted to pH 6.5 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.

Since translocation into tissues requires passage through tissue and endothelial fenestrations (~100-150 nm), nanoparticles that are stable colloiddally with a size around 60-100 nm are generally accepted for intravenous administration in preclinical and clinical trials. As a consequence, nanoparticles coated with low molecular (10 kDa) hyaluronic acid (1.4S) were selected for further optimization and characterization since this hyaluronian : **1**) stabilized nanoparticle size at ~ 80-100 nm, with an acceptable polydispersity index of ~ 0.2, irrespective of chitosan degree of deacetylation, molecular weight, and N:P:C ratio (**Figure 3-3, A**) and **2**) improved nanoparticle bioactivity by two-fold (**Figure 3-4**).

3.3.3 Addition of trehalose has no effect on nanoparticle size and polydispersity but greatly increases transfection efficiency at slightly acidic pH.

Trehalose is hypothesized to improve the stability of bio-macromolecular structures (*i.e.* polypeptide polymers) due to water exclusion and physical stabilization, therefore, allowing resistance to desiccation, freezing, and denaturation ²⁴. The effect of increasing trehalose concentrations on the size, polydispersity and *in vitro* bioactivity of formulations coated with the most efficient HA (10 kDa, 1.4S) was investigated. As shown in **Figure 3-5**, increasing the trehalose concentration from 0 to 10% had no significant effect on nanoparticle size or polydispersity for both coated and uncoated formulations. In contrast transfection efficiency, as indirectly estimated through the assessment of luciferase expression (activity), increased for both uncoated and HA-coated formulations (**Figure 3-6, A**). Uncoated formulations demonstrated a ~ 2-fold increase in bioactivity compared to the condition where no trehalose was added during preparation of the nanoparticles. HA coating, in the presence of trehalose, improved bioactivity by around 4-fold *versus* absence of trehalose. The increase in bioactivity reached ~30 % of the lipid control (**Figure 3-6, A**). However, the effect of pH on nanoparticle bioactivity was marked with a sharp decrease in luciferase expression (activity) reaching baseline levels of luminescence when transfection was performed at near physiological pH (~ 7.3-7.4) (**Figure 3-6, B**).

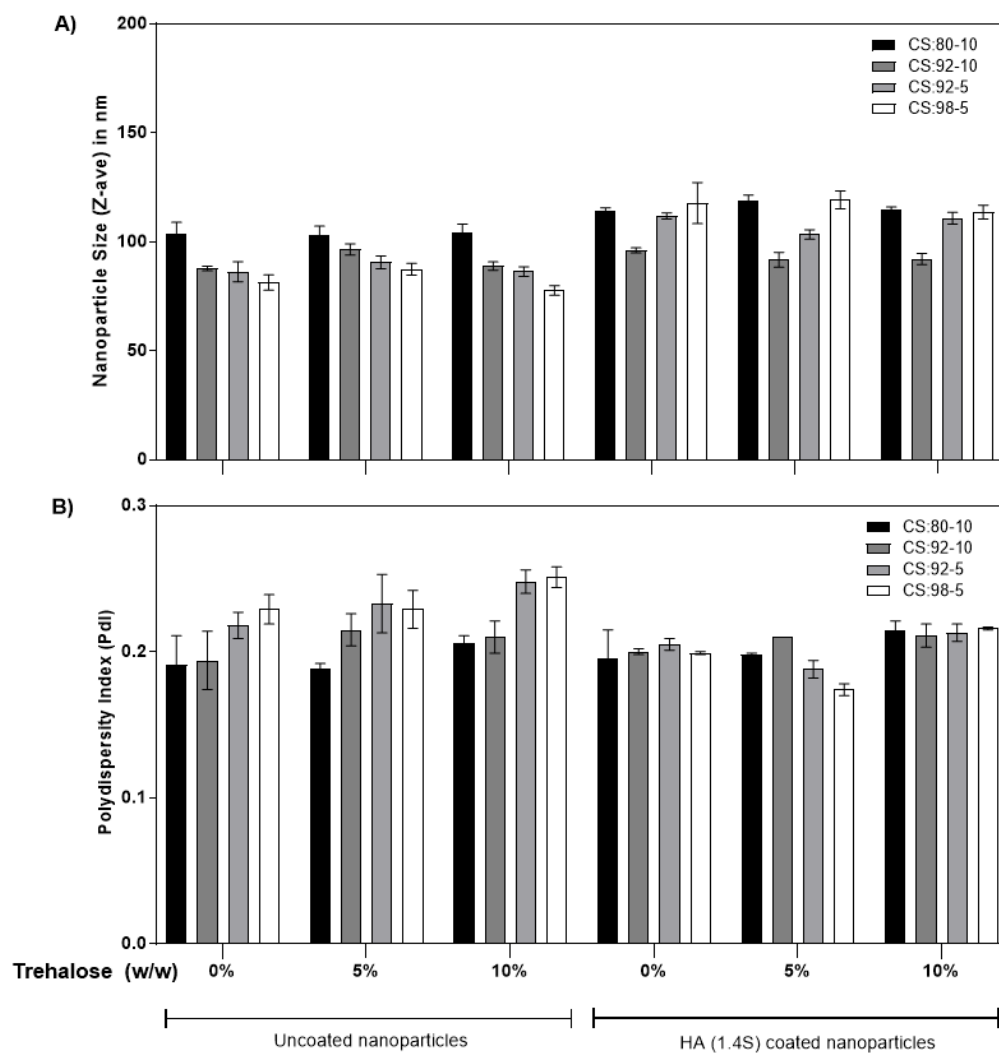


Figure 3-5. Minimal effect of trehalose concentration during mixing on nanoparticle size and polydispersity index. **A)** Effect of trehalose concentration (w/w) on uncoated and HA-coated nanoparticle size (Z-average); HA 1.4S-10 kDa N:P:C 5:1:1. **B)** Effect of trehalose concentration (w/w) on uncoated and HA-coated nanoparticle polydispersity index. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment ($N = 3$, $n = 6$).

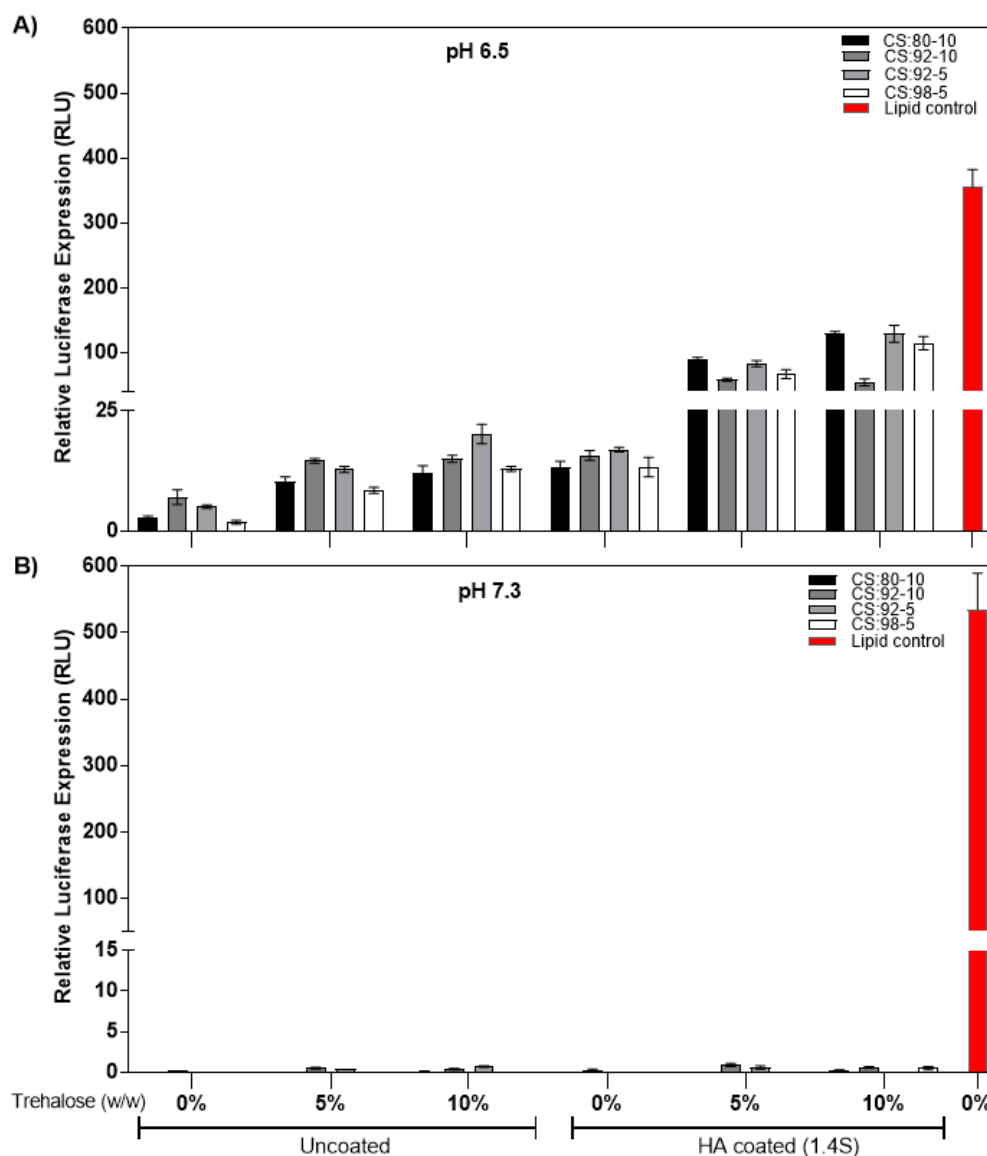


Figure 3-6. Effect of increasing trehalose concentrations on the bioactivity of uncoated and HA-coated (1.4 S) nanoparticles. Nanoparticles were formed in the presence of increasing trehalose concentrations (w/w) using a two-step methodology where chitosan and mRNA (0.15 mg/mL) were manually mixed at 1:1 (v/v) ratio, incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (Low Mn of 10 kDa, and a degree of sulfation of 1.4) at a P:C of 1:1 (positive particles). EGFP⁺ H1299 cells were transfected in the presence of 10% FBS, at pH 6.5 in (A) or 7.3 (B), at a final mRNA dose of 150 ng/well. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6). The media pH was adjusted to pH 6.5 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.

3.3.4 Hyaluronic acid competition suggests a role of receptor-mediated internalization in the improvement of nanoparticle bioactivity

In order to determine if the observed increase in bioactivity (**Figure 3-4** and **Figure 3-6**) was due to an interaction between the HA-coated nanoparticles and the H1299 surface CD44/RHAMM receptors^{22, 27}, cells were pre-treated with 30X the concentration of HA to saturate the CD44 receptors¹⁹, transfected at different N:P:C ratios and compared to controls. As illustrated in **Figure 3-7 A**, nanoparticle transfection efficiency decreased significantly to baseline levels following pre-treatment with HA. Given that the milieu is saturated with HA, positively charged particles prepared at N:P:C of 5:1:1 could undergo structural rearrangement and incorporate HA to their surface, therefore, limiting particle-membrane interactions and transfection efficiency (**Figure 3-4**). As a consequence, we hypothesized that an additional drop of bioactivity following HA saturation and subsequent transfection with negatively charged particles (N:P:C 5:1:7) compared to positively charged particles would indicate a clear role of CD44 saturation in the observed loss of bioactivity for positively charged NPs (**Figure 3-7 A**). As shown in **Figure 3-7 C**, pre-treatment with HA incurred an additional drop in bioactivity for negatively charged nanoparticles indicating that the observed bioactivity of HA nanoparticles (**Figure 3-4** and **Figure 3-6**) was most probably due to interaction with the CD44 receptors. Metabolic activity or cell cytotoxicity was not influenced by nanoparticles, the presence of trehalose or the saturation of the CD44 receptor (**Figure 3-7 B**).

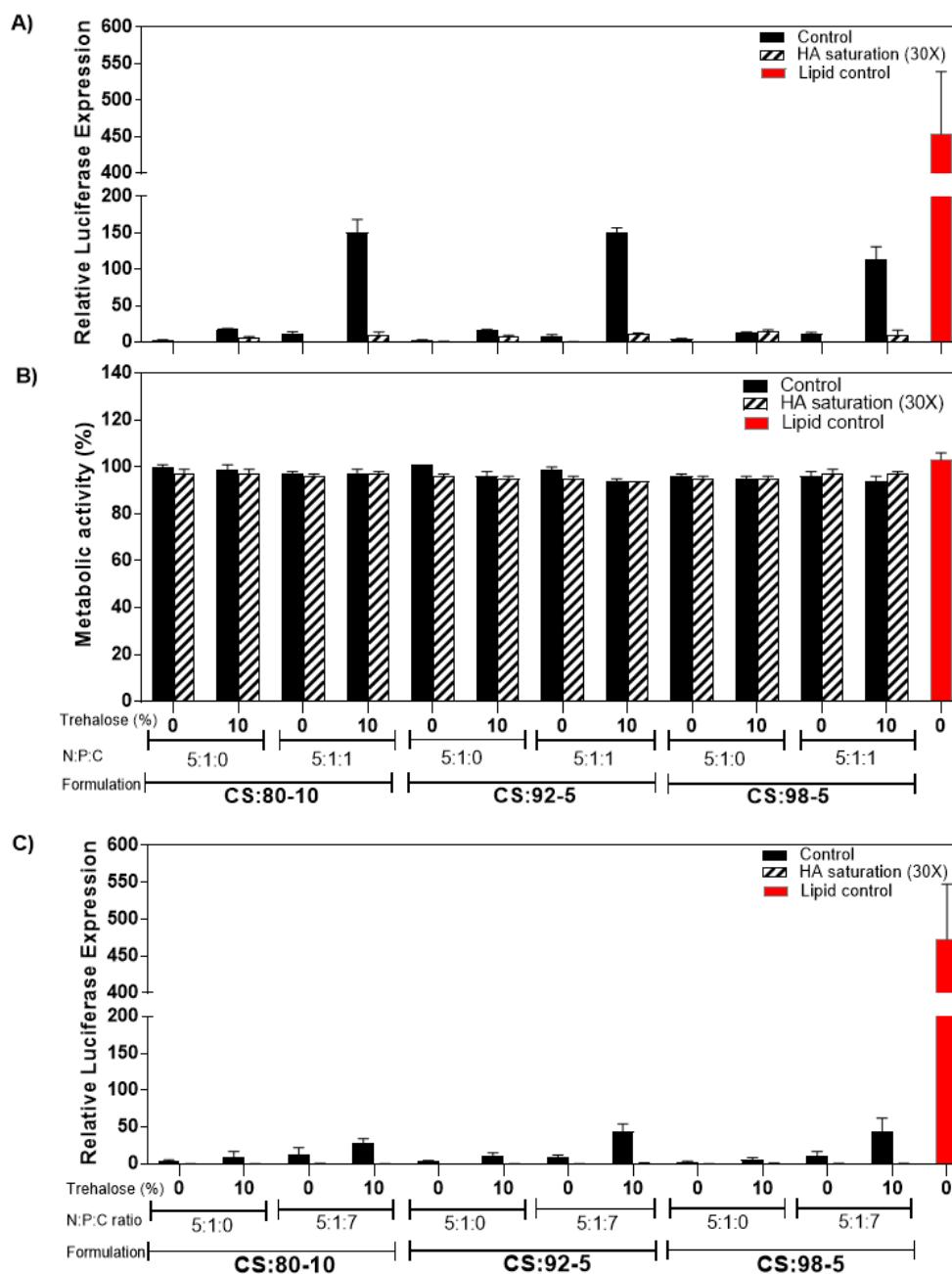


Figure 3-7 Effect of hyaluronic acid competition on nanoparticle bioactivity and toxicity. EGFP⁺ H1299 cells were treated with 30X HA for 30 min prior to transfection with HA (low Mn, 1.4 S) coated nanoparticles and compared to controls 48 hours post-transfection in the presence of 10% FBS, pH 6.5. **A)** Bioactivity of nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:1 (positively charged). **B)** metabolic activity of cells treated with nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:1 (positively charged) in the presence and absence of competing HA molecules. **C)** Bioactivity of nanoparticles prepared at an N:P:C ratio of 5:1:7 (negatively charged). Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6). The media pH was adjusted to pH 6.5–6.7 by buffering the RPMI-1640 media (pH 7.2–7.4) with 20 mM MOPS followed by a 1 N HCl titration.

3.3.5 Nanoparticle bioactivity can be further improved by optimizing mixing conditions with no metabolic effects.

In order to further improve nanoparticle bioactivity and optimize transfection efficiency, the effect of nucleic acid concentration during mixing was investigated since dilute *versus* concentrated mixing regimen yield particles with different sizes and, consequently different nucleic acid content^{13, 28-30}. As demonstrated in **Figure 3-8 A and C**, a dose-dependent increase in size and ζ -potential was observed when particles were formed at increasing nucleic acid concentrations. However, the polydispersity index remained relatively stable between 0.2-0.3 (**Figure 3-8 B**). Despite the slight increase in PDI from ~ 0.2 to 0.3 in comparison with historical data^{3, 13-14} and data in **Figure 3-3**, no signs of aggregation were detected in dynamic light scattering correlation functions (data not shown) suggesting that particles are colloidally stable for NA concentration up to 0.3 mg/mL during mixing; final concentration in particles equal 0.15 mg/mL.

In general, nanoparticle bioactivity increased with both mixing concentrations and dose (**Figure 3-9 A**) and was negatively affected with increased pH (**Figure 3-9 B**). Luciferase expression improved by more than two-fold reaching around 60% of the lipid control; a net improvement of 10-12 fold compared to uncoated particles (**Figure 3-2**). In the presence of trehalose (10%), nanoparticle bioactivity reached a plateau above a dose of 150 ng/well with mixing concentration showing only a marginal effect. In contrast, an unforeseen and 10 to 12-fold strong increase in bioactivity was observed in the absence of trehalose for coated particles prepared at high mixing concentrations (**Figure 3-9 A**, left side). Differences in colloid sedimentation rates for particles prepared in water *versus* trehalose in presence of high ionic strength media (i.e. transfection media) might explain the improved bioactivity of HA-coated particles prepared at high mixing concentration in the absence of trehalose. Indeed, forcing nanoparticles to sediment on cells via mild centrifugation, increased the bioactivity of all tested conditions suggesting that a significant percentage of nanoparticles population was suspended in the cell medium and did not contribute to transfection (**Figure S. 3-1**). However, these results do not explain the signal saturation in presence of trehalose (with or without centrifugation) and remain to be explored.

In vitro metabolic activity and cell toxicity was not influenced by either the mixing concentration (indirectly particle size), dose or the transfection pH indicating *in vitro* safety of the optimized system (Figure S. 3-2).

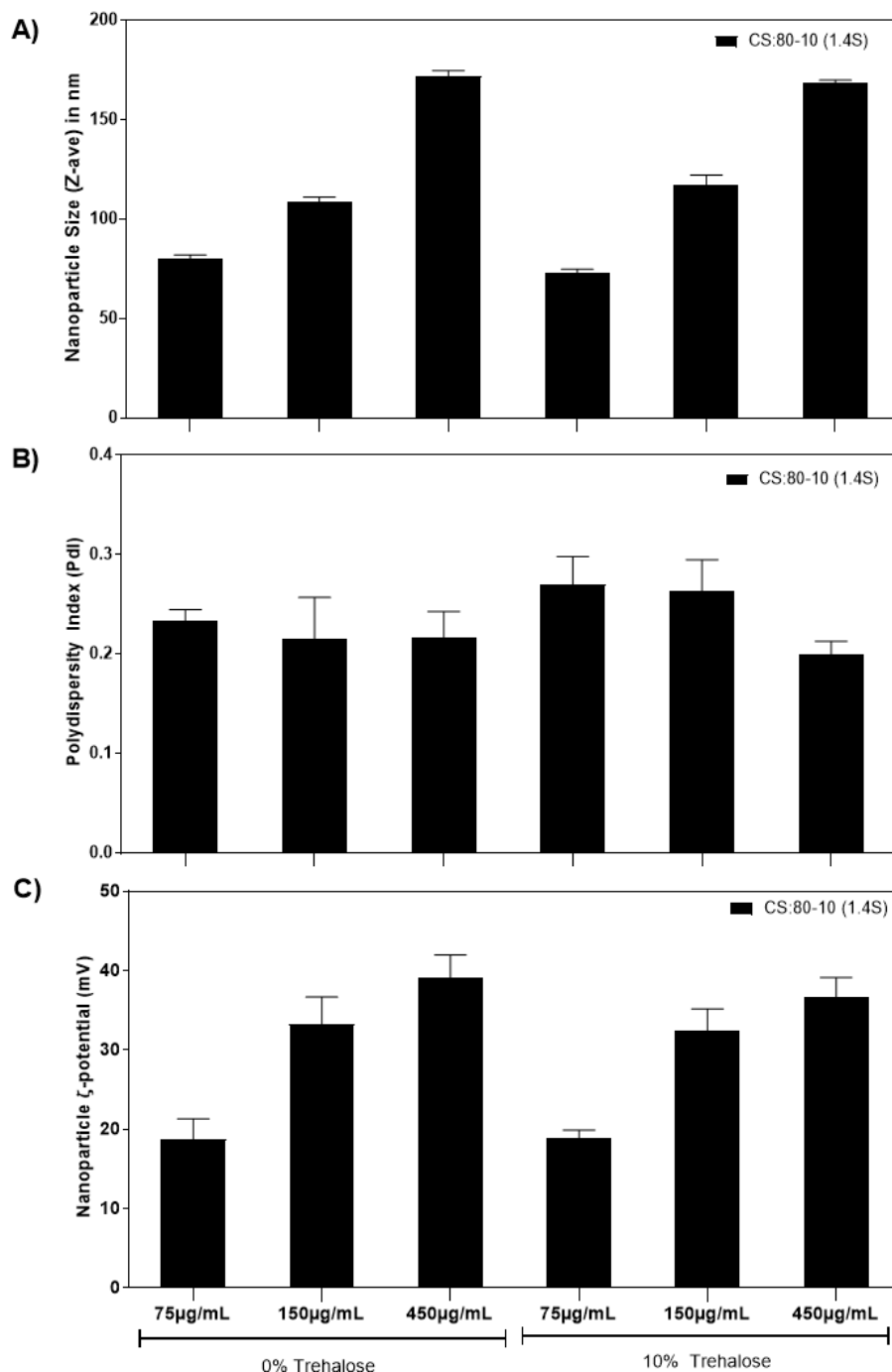


Figure 3-8. Influence of nucleic acid concentration during mixing on nanoparticle size, polydispersity and ζ -potential in the presence and absence of trehalose. A) Influence of FLuc mRNA concentration at the time of mixing on the size of hyaluronic acid coated (HA:1.4S-10 kDa) nanoparticles

prepared at a P:C ratio of 1. **B)** Influence on the polydispersity index of the nanoparticles. **C)** Influence on nanoparticle ζ -potential. Data represent the average $\pm$ standard deviation of 3 independent experiments with 2 technical replicates per experiment ($N = 3$, $n = 6$).

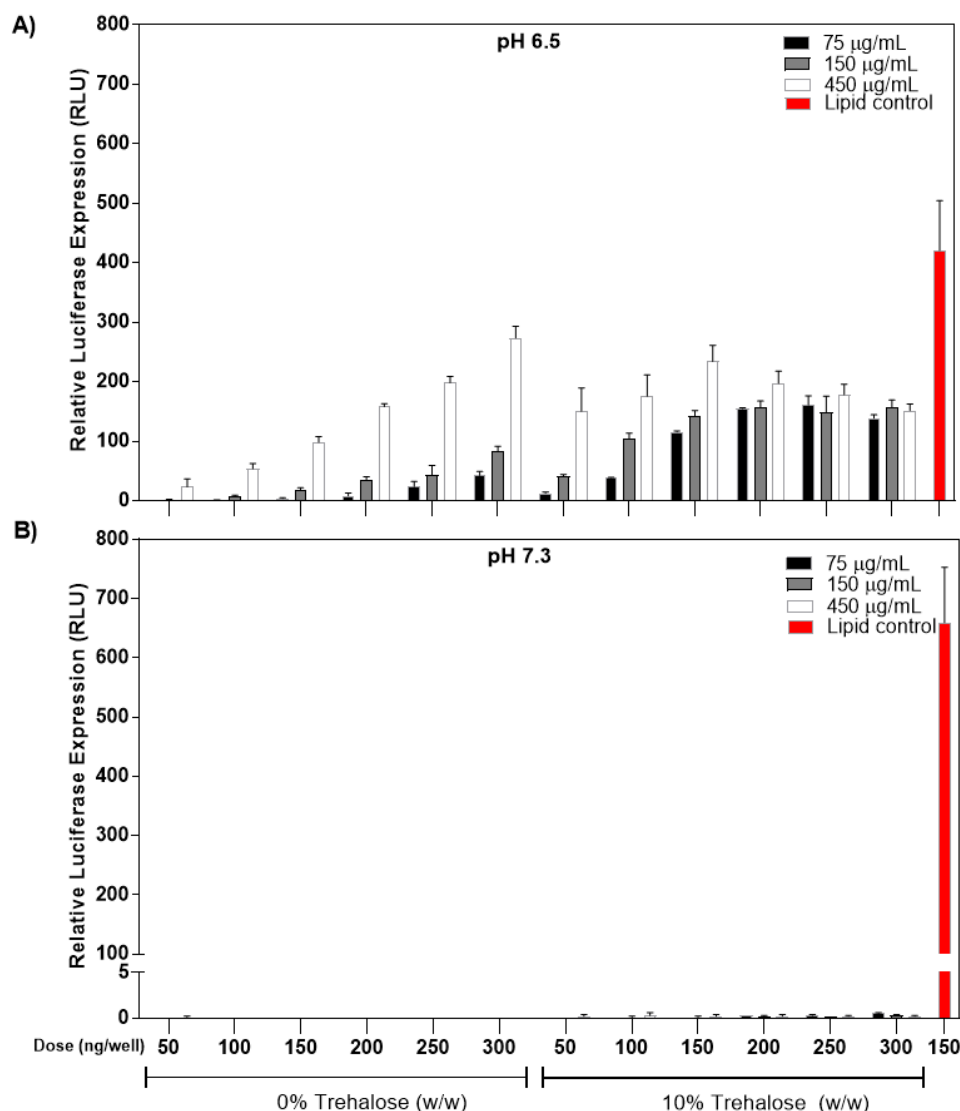


Figure 3-9 Effect of nucleic acid concentration and dose on coated nanoparticle bioactivity in the presence/absence of trehalose. Nanoparticles were formed in the absence (0 %) or presence (10 %) of trehalose using a two-step methodology where chitosan (CS: 80-10) was manually mixed at 1:1 (v/v) ratio with increasing concentrations of mRNA (75 to 450 µg/mL), incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (HA: 1.4S-10 kDa) at a P:C 1 (positive particles) using a particle to HA volumetric ratio of 2:1. EGFP⁺ H1299 cells were transfected at increasing nucleic acid doses and in the presence of 10% FBS, at either pH 6.5 in (A) or 7.3 (B). Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment ($N = 2$, $n = 4-6$).

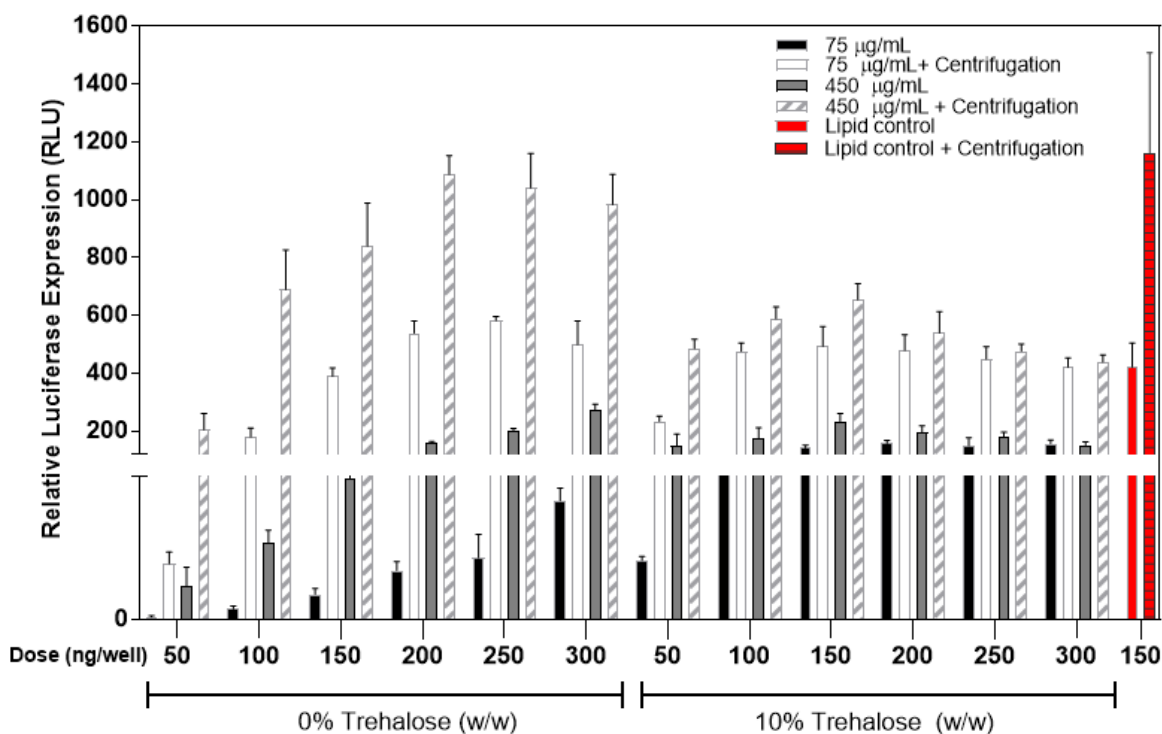


Figure S. 3-1 Effect of centrifugation on nanoparticle bioactivity. Nanoparticles were formed in the absence (0 %) or presence (10 %) of trehalose using a two-step methodology where chitosan (CS: 80-10) was manually mixed at 1:1 (v/v) ratio with increasing concentrations of mRNA (75 to 450 µg/mL), incubated for 10 min and coated with the optimal hyaluronic acid (HA: 1.4S-10 kDa) at a P:C 1 (positive particles). EGFP⁺ H1299 cells were transfected at increasing nucleic acid doses and in the presence of 10% FBS, pH 6.5. Plates were then subjected to centrifugation (2000 g) for 45 min to force contact between nanoparticles and cells and compared with plates without centrifugation. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment (N = 2, n = 4–6).

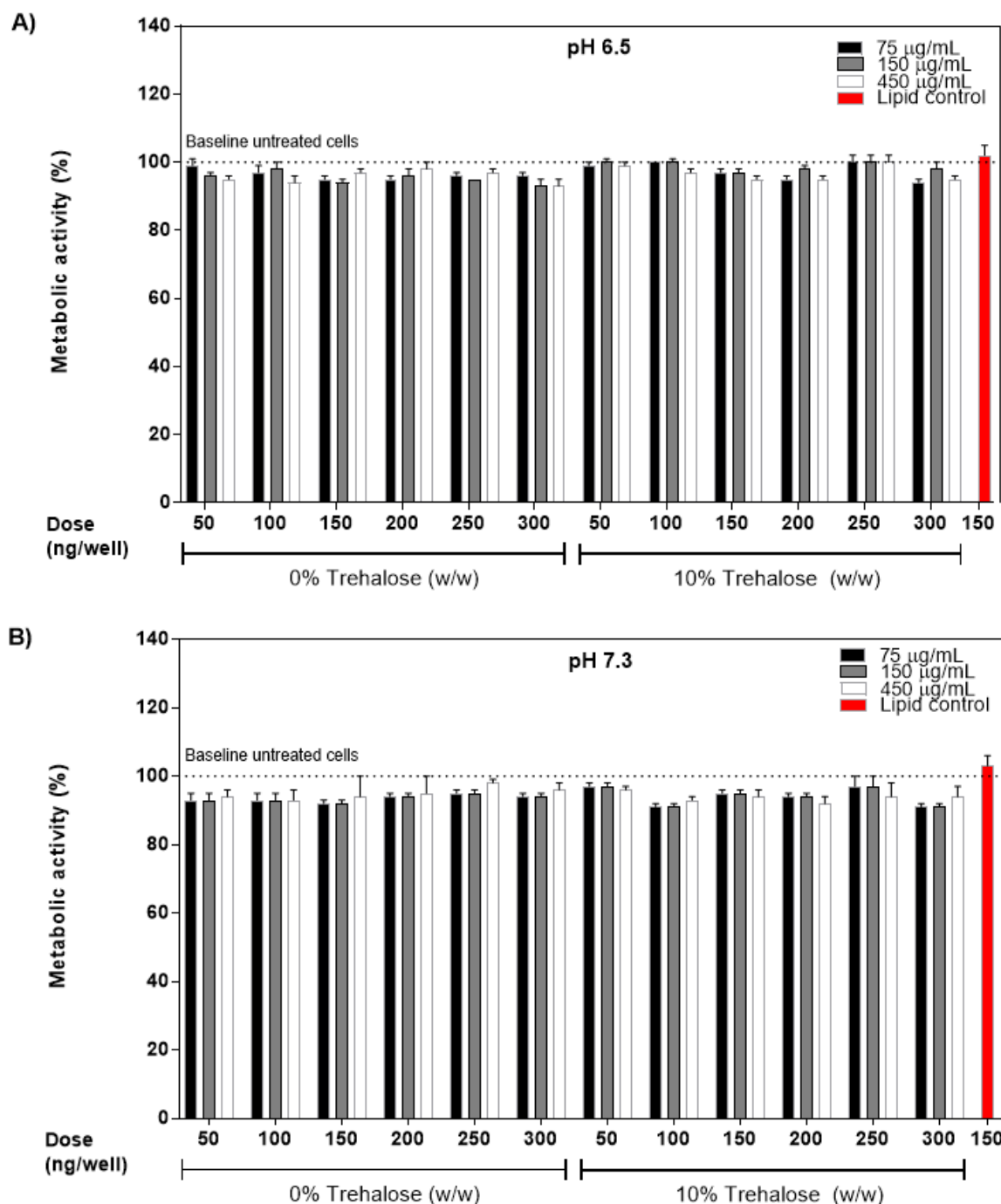


Figure S. 3-2 Effect of nucleic acid concentration and dose on coated nanoparticle metabolic activity (toxicity) in the presence/absence of trehalose. Nanoparticles were formed and transfected as described in **Figure 3-9**. Metabolic activity was measured using the alamarBlue assay 48 h post transfection. **A)** Transfection performed at pH 6.5. **B)** Transfection performed at pH 7.3. Data represent average $\pm$ standard deviation of at least 2 independent experiments with at least 2 or 3 technical replicates in each experiment ($N = 2$, $n = 4-6$).

3.4 Discussion

This study demonstrates the importance of several factors in improving the biological performance of chitosan-based nanoparticles for the delivery of messenger RNA, and shows that the system is amenable to *in vitro* transfection efficiencies approaching those of lipid formulations without toxicity. The effect of Mn, N:P ratio, pH and degree of deacetylation played an important role in dictating bioactivity of uncoated chitosan nanoparticles (**Figure 3-2**) with design principles reminiscent of those needed for plasmid DNA delivery and transgene expression^{4-6, 26}. These previous studies showed transgene expression occurred at intermediate to high DDA of chitosan with low Mn values suggesting the role of a fine balance between Mn and DDA in mediating nanoparticle extracellular stability and intracellular decomplexation. The effect of N:P ratio was also evident with a clear requirement of free chitosan for improved transgene expression confirming previous results where excess polycation was shown to mediate pDNA transfection efficiency and transgene expression through nanoparticle escape from endosomes³¹. Our findings highlight similar design principles for the delivery of mRNA. In contrast to the lipid control, uncoated formulations resulted in ~ 20-fold lower protein expression (luciferase activity) (**Figure 3-2**).

Lipid nanoparticles are highly efficient, in comparison with most polymeric systems, due to their endosomal escape mechanism³²⁻³⁴. In order to improve colloidal stability, hemocompatibility and transfection efficiency via modulation of surface properties and/or nanoparticle binding affinity with nucleic acids, a library of natural (unsulfated), or chemically modified (sulfated), hyaluronic acids was tested. In this study, low molecular weight HAs (10 kDa) with a high degree of sulfation (1.4 S), or charge density, improved nanoparticle bioactivity ~ 2-fold when compared to uncoated formulations (**Figure 3-4**). Improved bioactivity could possibly be attributed to the modulation of nanoparticle avidity, or cumulative strength of multiple affinities between CS amines and NA phosphates, through competition between the 1.4 S hyaluronic acid chains (highly charged) and the polyanionic NA cargo therefore facilitating intracellular decomplexation and subsequent Luc expression; an alternative explanation regarding increased bioactivity is discussed below and pertain to receptor mediated endocytosis. The destabilizing effect, or modulation of avidity through competition has been well established for chitosan-siRNA nanoparticles coated with HA³⁵ and, more generally for nucleic acid-polycation systems³⁶⁻³⁷.

Decreasing the negative charge per hyaluronic acid dimer, or the degree of sulfation (DS), decreased nanoparticle bioactivity to levels similar to uncoated controls (**Figure 3-4**). Lallana *et al*, demonstrated that nanoparticle dissociation in the presence of competing polyanions, depends on the nucleic acid cargo¹⁹, with mRNA based particles partially dissociating at very high charge ratios (25- 250) as a function of chitosan degree of deacetylation and chain length (Mn). Decreased bioactivity might therefore be due to a more stable and difficult to dissociate particle. The importance of this association/dissociation balance is highlighted by the drop in bioactivity when chitosan polymer length increased from 5 to 10 kDa in the presence of the competing polyanionic and highly sulfated HA (1.4S) (**Figure 3-4**). Increasing either DDA, Mn or both parameters has been previously reported to enhance particle stability and consequently decreases nucleic acid dissociation from nanoparticles^{3, 25, 38-39}. In this study, bioactivity decreased when nanoparticles were coated with high molecular weight hyaluronic acid (*viz.* HA:0S-866 and HA:1S-150) (**Figure 3-4**). The decrease in bioactivity can be explained by either an increase in nanoparticle stability due to longer HA chain length or nanoparticle aggregation in high ionic strength media. Alameh *et al* showed that chitosan nanoparticles are stable in water but rapidly aggregate in high ionic strength media/buffers (150 mM) with a kinetic that depend on nanoparticle size, and polymer length³; nanoparticle size formed/coated with high Mn HAs was around 2-4 fold higher than particles coated with low Mn HA (**Figure 3-3, A**).

Nanoparticles prepared at an N:P:C of 5:1:7 (negatively charged; **Figure 3-3 C**) showed a systematic decrease in bioactivity (**Figure 3-4** and **Figure 3-7**) compared to particles prepared at N:P:C of 5:1:1 (positively charged, **Figure 3-3 C**). The systematic decrease could be explained by limited electrostatic interactions with cell membranes due to repulsive electrostatic forces between the negative nanoparticles (5:1:7)⁴⁰ and cell membranes. In this study, bioactivity was systematically abrogated when transfection was performed at pH 7.3 (**Figure 3-6, 7** and **9**) confirming published data for plasmid DNA⁵ and mRNA¹⁹. This is probably due to chitosan deprotonation and subsequent decrease in nanoparticle stability, premature decomplexation, and aggregation.

In addition to the modulation of nanoparticle stability, hyaluronic acid is a well-known ligand for the CD44 receptor expressed on multiple cell lines and tumors. In order to validate if the improved bioactivity is also due to potential interactions with hyaluronic acid surface receptors and subsequent internalization by receptor-mediated endocytosis, a competition assay was

designed and tested. A decrease in nanoparticle bioactivity following pre-treatment and receptor saturation¹⁹ with excess HA (**Figure 3-7**) clearly demonstrated that hyaluronic acid is actively involved in nanoparticle internalization; confirming previous reports¹⁹ that further characterized this phenomenon. However, reduction in bioactivity due to steric hindrance and electrostatic repulsion of HA cannot be excluded.

In order to improve bioactivity and nanoparticle stability, trehalose was incorporated into the formulation. The stabilizing effect of trehalose on biomacromolecules, such as proteins, has been documented in the literature with multiple hypotheses to explain its effects⁴¹⁻⁴³. Bioactivity, or luciferase expression, of uncoated and HA-coated nanoparticles, increased four-fold reaching around 30-35% expression relative to the lipid control (**Figure 3-6**) for the most efficient formulations (viz. HA coated 1.4S). The intriguing effect of trehalose on bioactivity could potentially be explained by its kosmotropic properties where :1) rearrangement of water molecules around, as well as inside, nanoparticles is thought to lead to structural rearrangements probably enhancing HA exposition for improved interactions with its receptor and/or 2) improved nanoparticle stability by limiting interactive forces between nanoparticles and its environment. However, these two hypotheses need to be validated through additional experimental design and multiple experiments involving further structural characterization and, for example, binding experiments to the HA receptors.

Further improvement of bioactivity could be achieved by increasing dose and/or mRNA concentration during mixing and/or mixing regimen. In this study, improved bioactivity was observed in a dose-dependent manner, and relative to mixing concentration (**Figure 3-9**) with luciferase expression reaching around 60-65 % of the lipid control; a further 2-fold improvement in bioactivity. Interestingly, nanoparticle bioactivity plateaus above the 150 ng/well dose in presence of trehalose, contrasting with a steady bioactivity increase when particles are prepared in water. This behavior needs further exploration to elucidate its mechanistic principles.

Nanoparticle size and surface charge are two important factors that modulate colloidal stability, bioactivity and *in vivo* pharmacokinetics²⁰. In this study, nanoparticle size ranged between 80 and 110 nm (**Figure 3-1**). The degree of deacetylation, or the number of glucosamine residues, polymer length (Mn) and the N:P ratio had a minimal effect of particle size and polydispersity. Following optimization, nanoparticle size and polydispersity were not significantly affected in

presence of trehalose (10% w/w; ~ 0.26 M) indicating that increased osmotic pressure is not high enough to destabilize the system and cause aggregation and/or increase in particle size (**Figure 3-5**). Nanoparticle surface charge, or ζ -potential, was modulated via the increase of the N:P:C ratio for both uncoated and coated formulations (**Figure 3-1** and **Figure 3-3**). All three physicochemical parameters (i.e. size, PDI, and ζ -potential) increased with increasing nucleic acid mixing concentration (**Figure 3-8**) consistent with previously reported results using manual and in-line mixing of chitosan-pDNA¹³. Throughout this study, uncoated nanoparticles and particles optimized through coating, trehalose incorporation, HA competition, and/or nucleic acid mixing regimen/dose were non-toxic with no apparent change in metabolic activity relative to untreated cells (**Figure 3-7** and **Figure S. 3-2**) confirming previous data^{3, 5, 7, 10, 13, 16, 19, 21}.

3.5 Conclusion

We have shown that the presence of HA in mRNA loaded nanoparticles can increase *in vitro* bioactivity. This increase is attributable to the coupled effect of increasing cell internalization via potential interaction with the CD44/RHAMM receptors, and/or reduced nanoparticle avidity therefore allowing a better balance between complexation and decomplexation. Low Mn hyaluronic acids are superior than their high Mn counterparts at maintaining nanoparticle physicochemical properties and improving bioactivity especially when sulfated. In addition, we show that N:P:C ratio, trehalose, mixing concentration and nucleic acid dose play important roles in improving bioactivity. Most importantly, we showed that optimized formulations are able to reach around 60-65% transfection efficiency at slightly acidic pH, or luciferase expression, relative to commercially available lipid control with no apparent toxicity. In contrast to the only published manuscript on chitosan mRNA delivery, we demonstrate significant improvement in bioactivity following parameter optimization and addition of a kosmotropic agent.

3.6 Acknowledgments

This work was supported by PRIMA Québec and ANRis pharmaceuticals. The funding source had no role in study design, data collection, analysis, interpretation of data, writing or decision to submit this manuscript. The authors would like to thank Martine Bail for assistance with the

transfection experiments, Dr Garima Dwivedi (MIT) for critically revising the manuscript, and Julie Tremblay for quality control.

1. References

1. Buschmann, M. D.; Merzouki, A.; Lavertu, M.; Thibault, M.; Jean, M.; Darras, V., Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, 65 (9), 1234-70.
2. Ma, P. L.; Lavertu, M.; Winnik, F. M.; Buschmann, M. D., New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (6), 1490-9.
3. Alameh, M.; Lavertu, M.; Tran-Khanh, N.; Chang, C. Y.; Lesage, F.; Bail, M.; Darras, V.; Chevrier, A.; Buschmann, M. D., siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. *Biomacromolecules* **2018**, 19 (1), 112-131.
4. Koping-Hoggard, M.; Varum, K. M.; Issa, M.; Danielsen, S.; Christensen, B. E.; Stokke, B. T.; Artursson, P., Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther* **2004**, 11 (19), 1441-52.
5. Lavertu, M.; Methot, S.; Tran-Khanh, N.; Buschmann, M. D., High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* **2006**, 27 (27), 4815-24.
6. Strand, S. P.; Lelu, S.; Reitan, N. K.; de Lange Davies, C.; Artursson, P.; Varum, K. M., Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials* **2010**, 31 (5), 975-87.
7. Malmo, J.; Sorgard, H.; Varum, K. M.; Strand, S. P., siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *J Control Release* **2012**, 158 (2), 261-8.
8. Thibault, M.; Nimesh, S.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D., Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol Ther* **2010**, 18 (10), 1787-95.
9. Nimesh, S.; Thibault, M. M.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D., Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Mol Biotechnol* **2010**, 46 (2), 182-96.
10. Alameh, M.; Jean, M.; Dejesus, D.; Buschmann, M. D.; Merzouki, A., Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *Int J Nanomedicine* **2010**, 5, 473-81.
11. Alameh, M.; Dejesus, D.; Jean, M.; Darras, V.; Thibault, M.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D.; Merzouki, A., Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *Int J Nanomedicine* **2012**, 7, 1399-414.
12. Jean, M.; Alameh, M.; De Jesus, D.; Thibault, M.; Lavertu, M.; Darras, V.; Nelea, M.; Buschmann, M. D.; Merzouki, A., Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination

gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci* **2012**, 45 (1-2), 138-49.

13. Tavakoli Naeini, A.; Soliman, O. Y.; Alameh, M. G.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D., Automated in-line mixing system for large scale production of chitosan-based polyplexes. *J Colloid Interface Sci* **2017**, 500, 253-263.

14. Veilleux, D.; Gopalakrishna Panicker, R. K.; Chevrier, A.; Biniecki, K.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D., Lyophilisation and concentration of chitosan/siRNA polyplexes: Influence of buffer composition, oligonucleotide sequence, and hyaluronic acid coating. *J Colloid Interface Sci* **2018**, 512, 335-345.

15. Jean, M.; Alameh, M.; Buschmann, M. D.; Merzouki, A., Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther* **2011**, 18 (8), 807-16.

16. Corbet, C.; Ragelle, H.; Pourcelle, V.; Vanvarenberg, K.; Marchand-Brynaert, J.; Preat, V.; Feron, O., Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. *J Control Release* **2016**, 223, 53-63.

17. Gao, S.; Hein, S.; Dagnaes-Hansen, F.; Weyer, K.; Yang, C.; Nielsen, R.; Christensen, E. I.; Fenton, R. A.; Kjems, J., Megalin-mediated specific uptake of chitosan/siRNA nanoparticles in mouse kidney proximal tubule epithelial cells enables AQP1 gene silencing. *Theranostics* **2014**, 4 (10), 1039-51.

18. Balan, V.; Verestiuc, L., Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal* **2014**, (53), 171-188.

19. Lallana, E.; Rios de la Rosa, J. M.; Tirella, A.; Pelliccia, M.; Gennari, A.; Stratford, I. J.; Puri, S.; Ashford, M.; Tirelli, N., Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery. *Mol Pharm* **2017**, 14 (7), 2422-2436.

20. Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* **2009**, 8 (7), 543-57.

21. Ragelle, H.; Riva, R.; Vandermeulen, G.; Naeye, B.; Pourcelle, V.; Le Duff, C. S.; D'Haese, C.; Nysten, B.; Braeckmans, K.; De Smedt, S. C.; Jerome, C.; Preat, V., Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J Control Release* **2014**, 176, 54-63.

22. Naor, D.; Nedvetzki, S.; Golan, I.; Melnik, L.; Faitelson, Y., CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2002**, 39 (6), 527-79.

23. Goodison, S.; Urquidi, V.; Tarin, D., CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **1999**, 52 (4), 189-96.

24. Katyal, N.; Deep, S., Revisiting the conundrum of trehalose stabilization. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, 16 (48), 26746-61.

25. Kiang, T.; Wen, J.; Lim, H. W.; Leong, K. W., The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials* **2004**, 25 (22), 5293-301.

26. Koping-Hoggard, M.; Mel'nikova, Y. S.; Varum, K. M.; Lindman, B.; Artursson, P., Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *J Gene Med* **2003**, 5 (2), 130-41.
27. Leung, E. L.; Fiscus, R. R.; Tung, J. W.; Tin, V. P.; Cheng, L. C.; Sihoe, A. D.; Fink, L. M.; Ma, Y.; Wong, M. P., Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One* **2010**, 5 (11), e14062.
28. Belliveau, N. M.; Huft, J.; Lin, P. J.; Chen, S.; Leung, A. K.; Leaver, T. J.; Wild, A. W.; Lee, J. B.; Taylor, R. J.; Tam, Y. K.; Hansen, C. L.; Cullis, P. R., Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids* **2012**, 1, e37.
29. Kasper, J. C.; Schaffert, D.; Ogris, M.; Wagner, E.; Friess, W., The establishment of an up-scaled micro-mixer method allows the standardized and reproducible preparation of well-defined plasmid/LPEI polyplexes. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, 77 (1), 182-5.
30. Zelphati, O.; Nguyen, C.; Ferrari, M.; Felgner, J.; Tsai, Y.; Felgner, P. L., Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther* **1998**, 5 (9), 1272-82.
31. Thibault, M.; Astolfi, M.; Tran-Khanh, N.; Lavertu, M.; Darras, V.; Merzouki, A.; Buschmann, M. D., Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials* **2011**, 32 (20), 4639-46.
32. Mui, B.; Ahkong, Q. F.; Chow, L.; Hope, M. J., Membrane perturbation and the mechanism of lipid-mediated transfer of DNA into cells. *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1467 (2), 281-92.
33. Wan, C.; Allen, T. M.; Cullis, P. R., Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv Transl Res* **2014**, 4 (1), 74-83.
34. Shete, H. K.; Prabhu, R. H.; Patravale, V. B., Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery. *J Nanosci Nanotechnol* **2014**, 14 (1), 460-74.
35. Al-Qadi, S.; Alatorre-Meda, M.; Zaghloul, E. M.; Taboada, P.; Remunan-Lopez, C., Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: the role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2013**, 103, 615-23.
36. Danielsen, S.; Maurstad, G.; Stokke, B. T., DNA-polycation complexation and polyplex stability in the presence of competing polyanions. *Biopolymers* **2005**, 77 (2), 86-97.
37. Lesley, J.; Hascall, V. C.; Tammi, M.; Hyman, R., Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* **2000**, 275 (35), 26967-75.
38. Danielsen, S.; Varum, K. M.; Stokke, B. T., Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (3), 928-36.
39. Koping-Hoggard, M.; Tubulekas, I.; Guan, H.; Edwards, K.; Nilsson, M.; Varum, K. M.; Artursson, P., Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* **2001**, 8 (14), 1108-21.

40. Nafee, N.; Taetz, S.; Schneider, M.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M., Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine* **2007**, 3 (3), 173-83.
41. Allison, S. D.; Chang, B.; Randolph, T. W.; Carpenter, J. F., Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* **1999**, 365 (2), 289-98.
42. Belton, P. S.; Gil, A. M., IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers* **1994**, 34 (7), 957-61.
43. Sampedro, J. G.; Uribe, S., Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* **2004**, 256-257 (1-2), 319-27.

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans le cadre de l'étude publiée, qui a été présentée dans le **Chapitre 3**, différentes combinaisons de polyplexes formés de chitosane, d'acide hyaluronique et d'ARNm codant pour la luciférase ont été produites, caractérisées par DLS/ELS et transfectées dans des cellules eGFP⁺ H1299 à différents pH.

Tel que mentionné dans le **Chapitre 2**, il a été établi dans la littérature que la masse molaire et la densité de charge du chitosane jouent un rôle important dans la stabilité colloïdales lors de la formation de polyplexes et ont une influence directe sur l'efficacité de transfection. Les résultats du dépistage avec les systèmes binaires CS/ARNm présentés dans le **Chapitre 3** sont cohérents avec la littérature pour les systèmes CS/ADNp, mais différent des systèmes CS/ARNi (Alameh et al., 2018; Lavertu et al., 2006; Malmo et al., 2012; Thibault et al., 2010). Un équilibre entre l'avidité des polyélectrolytes et la facilité de dissociation de l'acide nucléique doit être atteint pour les PEC binaires CS/ARNm et CS/ADNp, alors que les systèmes CS/ARNi semblent démontrer une bioactivité qui augmente avec l'augmentation de l'avidité. Les similarités entre les systèmes CS/ARNm et CS/ADNp peuvent être dues à leur taille similaire, leur conférant, toute chose étant égale, une avidité plus élevée que les systèmes CS/ARNi qui rend la libération d'ARNm et ADNp plus difficile. Le tableau ci-dessous présente les similarités et différences des paramètres optimaux pour les systèmes CS/ADNp, CS/ARNi et CS/ARNm basé sur des publications du laboratoire de biomatériaux et du cartilage (BCL) (Alameh et al., 2018; Lavertu et al., 2006; Thibault et al., 2010):

Tableau 4-1. Comparaison des paramètres optimaux pour la livraison d'ARNm, ARNi et ADNp in vitro.

PEC binaires	Masse molaire (Mn)	pH	Degré de déacetylation	Commentaire
CS/ARNm	5kDa ≤ Mn ≤ 10kDa	6.5	80% ≤ DDA	Augmentation Mn doit être compensé par une baisse du DDA et vice versa
CS/ADNp	Mn ≤ 10kDa	6.5	80% ≤ DDA	Augmentation Mn doit être compensé par une baisse du DDA et vice versa
CS/ARNi	5 kDa ≤ Mn	6.5 à 7.4	92% ≤ DDA	-

Suite à l'ajout d'acide hyaluronique à différentes densités de charge ou masse molaire, une augmentation marquée de l'expression génique est observée lorsque l'HA utilisé a une densité de

charge suffisamment élevée et une faible masse molaire, alors que l'expression n'augmente pas par rapport aux systèmes binaires CS/ARNm suite à l'ajout d'HA natif (non sulfaté). Les différences en bioactivité peuvent être expliquées par un effet combiné des interactions spécifiques entre l'HA et des récepteurs à la surface des cellules transfectées, et une déstabilisation contrôlée des nanoparticules permettant d'aboutir à un équilibre entre une condensation suffisante des nanoparticules pour protéger l'ARNm et une facilité de dissociation permettant la libération intracellulaire de l'ARNm. L'essai de compétition présenté dans le **Chapitre 3** suggère que des interactions spécifiques entre l'HA et des récepteurs à la surface des cellules tumorales (CD44 ou RHAMM) permettent d'augmenter la bioactivité en permettant un plus grand taux d'internalisation cellulaire. Toutefois, la baisse d'expression observée suite au pré traitement des cellules avec un excès d'acide hyaluronique pourrait être causée par un encombrement stérique à la surface des cellules, inhibant l'internalisation cellulaire. Afin de déterminer s'il s'agit vraiment d'un effet de compétition avec les récepteurs, il serait nécessaire d'effectuer une expérience dans laquelle des cellules seront transfectées avec les formulations ternaires optimales après avoir inhibé l'expression des récepteurs HA à leur surface. Il serait aussi nécessaire de quantifier la quantité de récepteurs présents avant et après l'inhibition pour valider que, s'il y a une différence de bioactivité, elle est due à une absence de récepteurs HA à la surface des cellules.

La figure suivante illustre les résultats de Lallana et. al., publié en 2017. On peut constater que l'administration d'ARN interférent démontre une bioactivité plus importante comparée à l'administration de l'ARNm et que l'expression d'ARNi n'est pas affectée par une augmentation du pH. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été reporté dans la littérature (Alameh et al., 2018; Bustin et al., 2009; Holzerny et al., 2012; Howard et al., 2006; Ji et al., 2009; Liu et al., 2007; Malmo et al., 2012). En comparant les niveaux d'expression d'ARNm avec les résultats présenté dans le **Chapitre 3**, on constate que leur meilleure formulation pour la livraison d'ARNm atteint 1% du contrôle positif, alors que pour la formulation ternaire optimisée dans l'étude de ce mémoire, l'expression atteint plus de 60% du contrôle positif. De plus, la diminution drastique d'expression avec une baisse de la densité de charge rapportée par Lallana et al. suggère que l'utilisation de chitosane avec un $DDA \leq 80\%$ réduit la bioactivité, quel que soit la masse molaire. L'avidité faible des nanoparticules est probablement à l'origine d'une dissociation prématurée des particules et la et donc d'une perte d'efficacité lorsque des chitosanes

de faible DDA sont utilisés. L'expression limitée observée pour toutes les formulations testées par Lallana et al. est vraisemblablement due à sélection sous-optimale des caractéristiques (DDA et Mn) du chitosane. Il est à noter que conformément à ce qui a été présenté au **Chapitre 3**, il n'y a plus d'expression lorsque les particules sont transfectées à pH physiologique.

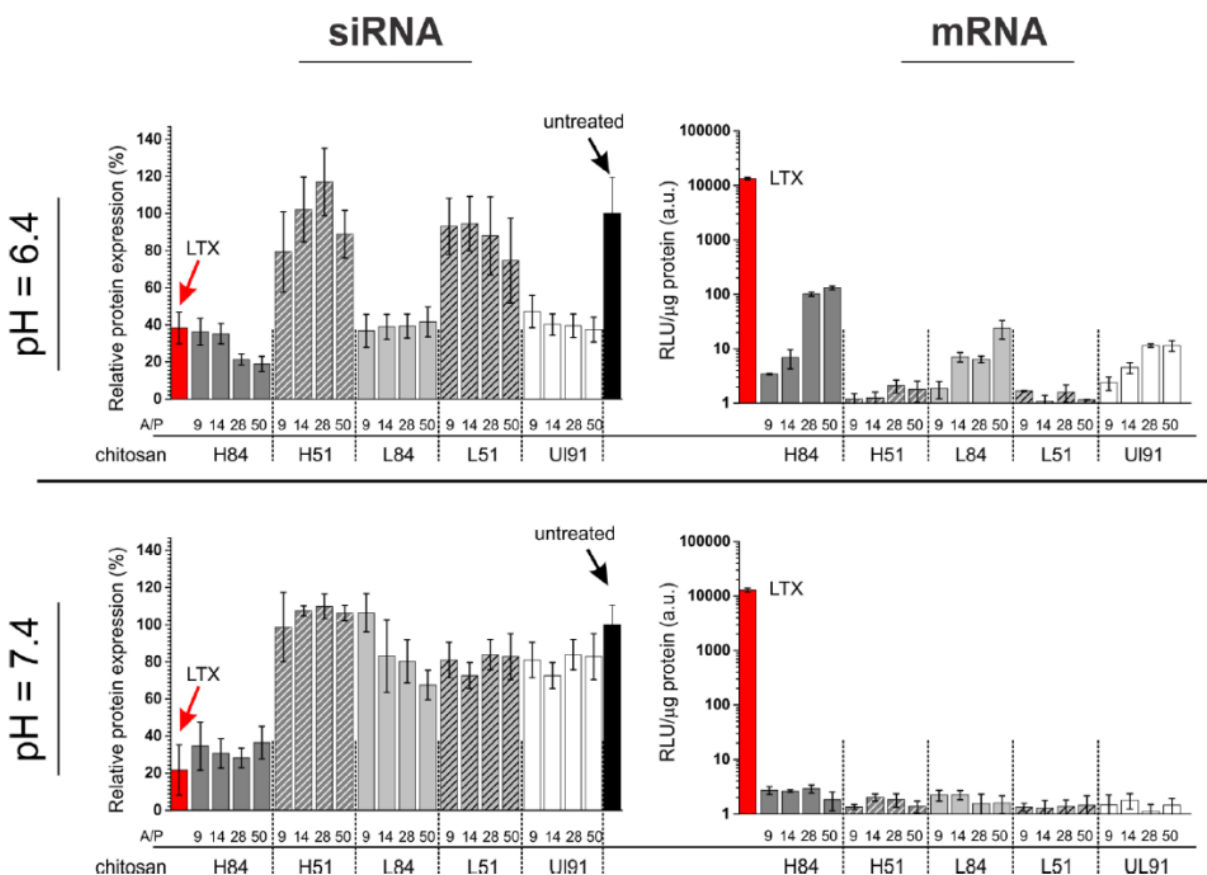


Figure 4-1. Résultats principaux de la seule autre publication traitant sur des systèmes ternaires HA-CS/ARNm. L'expression d'ARNm et d'ARNsi est présentée suite à la transfection de différentes formulations de particules ternaires à pH physiologique (7.4) et intra-tumoral (6.5). Adaptée de (Lallana et al., 2017). © American Chemical Society 2018, reproduit avec permission

Il est raisonnable de supposer que les particules contenant de l'HA fortement anionique démontrent un plus grand niveau d'expression que ceux préparés avec un HA natif, car l'avidité du système est réduite suite à l'ajout d'un polyanion qui entre en compétition avec l'ARNm, facilitant ainsi sa libération. L'HA natif aura donc une densité de charge trop faible pour déstabiliser les nanoparticules binaires de façon significative. Cela sous-entend aussi que les ARNm sont plus à risque d'être libérés prématurément ou de devenir plus accessibles aux

nucléases si les nanoparticules ternaires sont moins condensées dû à la présence d'un HA fortement chargé. Les résultats ont démontré que la présence de tréhalose en concentration relativement faible (0.26M) permet d'amplifier la bioactivité *in vitro*. Considérant l'hypothèse de remplacement de l'eau rapporté dans la littérature (Carpenter & Crowe, 1989; Crowe et al., 1984), il est possible que cette bioactivité améliorée soit liée à un enrobage des nanoparticules par une matrice vitreuse de tréhalose qui réduit la libération spontanée de l'ARNm. De plus, la nature kosmotrope du tréhalose pourrait faire en sorte que la conformation du HA en surface des PECs permet une meilleure interaction/internalisation avec les récepteurs à la surface des cellules.

Il est possible que la présence d'HA sulfaté, couplé avec la présence d'une matrice vitreuse enrobant les particules permet de bénéficier de la libération facilitée de l'ARNm tout en réduisant son exposition aux nucléases ou sa libération prématurée. Bref, il est possible que la présence du tréhalose réduise l'effet secondaire indésirable de la déstabilisation par HA. De plus, si la viscosité au sein des nanoparticules est plus élevée à cause de la présence du tréhalose, une libération plus lente et contrôlée de l'ARNm dans le cytoplasme pourrait avoir lieu, quoi que ce soit peu probable compte tenu de la faible concentration de tréhalose. Ceci expliquera pourquoi l'expression détectée avec des systèmes contenant du tréhalose atteint un plateau avec l'augmentation de la concentration et de la dose.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le développement de système de livraisons de gènes pour la thérapie génique est un domaine de recherche complexe qui est en croissance depuis les dernières décennies. Les complexités des systèmes physiologiques dans lequel s'incorporent ces systèmes de livraison font en sorte qu'il est plus facile d'effectuer des optimisations empiriques que d'essayer de développer des modèles prédictifs pour concevoir des systèmes de livraison. Moduler la formulation de complexes polyélectrolytes et les transfecter *in vitro* permet de facilement observer la bioactivité pour des combinaisons de polyélectrolytes à différentes masses molaires, densités de charges et ratios de mélange, permettant ainsi de trouver une formulation optimale pour un acide nucléique spécifique. Cette étude met en évidence l'importance de la densité de charge du chitosane et de l'acide hyaluronique, de leur masse molaire et du rapport molaire (amine) : (phosphate) : (carboxyle et sulfate) des polyplexes pour une performance *in vitro* efficace et non toxique.

Les hypothèses présentées dans l'introduction étaient les suivantes :

- Les nanoparticules ayant une charge de surface positive présenteront une meilleure efficacité de transfection *in vitro* par rapport aux nanoparticules préparées avec une charge de surface négative due à la nature anionique de la membrane cellulaire.
- Les nanoparticules préparées avec du chitosane de grands poids moléculaires auront une efficacité réduite due à une condensation trop forte des nanoparticules, limitant la libération intracellulaire de l'ARNm de façon similaire aux systèmes CS/ADNp. (Lavertu et al., 2006; Thibault et al., 2010)
- L'ajout de HA sulfaté dans les nanoparticules augmentera l'efficacité de la transfection par rapport aux HA non sulfatés en raison de sa densité de charge plus élevée, résultant en une compétition accrue avec l'ARNm, pouvant inciter sa libération intracellulaire

Les résultats attendus ont été observés, mais la validation des mécanismes sous-jacents proposés dans nos hypothèses nécessitera des travaux de recherche supplémentaire. En effet, les nanoparticules ayant une charge nette positive à la surface présentent de meilleurs niveaux d'expression de luciférase comparée aux nanoparticules préparés avec les mêmes polyélectrolytes, mais avec une stœchiométrie qui leur confère une charge négative. Deuxièmement, il a été observé que les PEC binaires et ternaires préparés avec du CS, ou même

de l'HA, de grandes masses molaires démontrent une absence d'expression ou bien des niveaux d'expression très faibles. De plus, l'ajout d'HA non sulfaté ne démontre aucune valeur ajoutée alors que l'ajout d'HA ayant une densité de charge suffisamment élevée permet d'augmenter la bioactivité de façon significative. Une observation inattendue est le fait que le tréhalose amplifie l'expression génique se façon systématique et très prononcée.

Les explications suggérées pour les résultats obtenus ne sont que des suppositions basées sur la revue de littérature. Pour être en mesure d'élucider le mécanisme qui résulte en cette augmentation significative de la bioactivité, il faudrait avoir une compréhension plus approfondie des interactions moléculaires complexes qui ont lieu lorsque des polyélectrolytes exogènes sont présents dans un organisme, ceci dépasse le cadre de cette étude et serait du domaine de la recherche fondamentale en biologie moléculaire et en biochimie. La formulation optimale établie dans cette étude est optimisée pour une transfection *in vitro*. Pour aboutir à une application clinique réelle, il est nécessaire d'effectuer un dépistage similaire *in vivo*. Dépendant de la route d'administration, il est possible qu'il y ait des différences quant à la combinaison optimale de chitosane, acide hyaluronique et tréhalose afin de livrer efficacement l'ARNm *in vivo*.

Afin d'élucider le mécanisme qui fait en sorte que le tréhalose améliore la bioactivité des PEC aux faibles doses d'ARNm (≤ 150 ng), il serait raisonnable de commencer par vérifier si le tréhalose a une influence sur l'efficacité d'encapsulation de l'ARNm. La concentration d'ARNm libre pourrait être quantifié en présence et absence de tréhalose à différents temps suite à la formation des PEC ternaires. De plus, des essais de compétition avec des polyanions tel que l'héparine pourraient être faits en présence et absence de tréhalose.

Des expériences supplémentaires seront également nécessaires pour vérifier si la bioactivité améliorée avec l'HA est bien due à des interactions avec des récepteurs spécifiques. Des expériences de transfection à la suite d'une inhibition de l'expressions de ces récepteurs ainsi que des mesures de l'ARNm libre en présence/absence d'HA permettront de mieux comprendre le rôle du HA dans le processus de transfection. Finalement, des mesures de la taille et de la charge de surface des particules dans le milieu de transfection seraient pertinentes pour déterminer la structure finale des PEC une fois que les protéines du milieu sont adsorbées à leur surface.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarntzen, E. H., Schreibelt, G., Bol, K., Lesterhuis, W. J., Croockewit, A. J., de Wilt, J. H., . . . Adema, G. J. (2012). 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(19), 5460-5470. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3368
- Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., . . . Maier, M. A. (2010). Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther*, 18(7), 1357-1364. doi:10.1038/mt.2010.85
- Al-Qadi, S., Alatorre-Meda, M., Zaghloul, E. M., Taboada, P., & Remunan-Lopez, C. (2013). Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: the role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 615-623. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.11.009
- Alameh, M., Lavertu, M., Tran-Khanh, N., Chang, C. Y., Lesage, F., Bail, M., . . . Buschmann, M. D. (2018). siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. *Biomacromolecules*, 19(1), 112-131. doi:10.1021/acs.biomac.7b01297
- Almalik, A., Day, P. J., & Tirelli, N. (2013). HA-coated chitosan nanoparticles for CD44-mediated nucleic acid delivery. *Macromol Biosci*, 13(12), 1671-1680. doi:10.1002/mabi.201300302
- Barbucci, R., Lamponi, S., Magnani, A., & Renier, D. (1998). The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials*, 19(7-9), 801-806.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, 235, 337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D., & Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 184(2), 465-472.
- Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., & Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med*, 6(10), 1102-1111. doi:10.1002/jgm.598
- Bol, K. F., Figdor, C. G., Aarntzen, E. H., Welzen, M. E., van Rossum, M. M., Blokx, W. A., . . . de Vries, I. J. (2015). Intranodal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology*, 4(8), e1019197. doi:10.1080/2162402X.2015.1019197
- Bonnet, M. E., Erbacher, P., & Bolcato-Bellemin, A. L. (2008). Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm Res*, 25(12), 2972-2982. doi:10.1007/s11095-008-9693-1

- Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(9), 1234-1270. doi:10.1016/j.addr.2013.07.005
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Buyens, K., Meyer, M., Wagner, E., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2010). Monitoring the disassembly of siRNA polyplexes in serum is crucial for predicting their biological efficacy. *J Control Release*, 141(1), 38-41. doi:10.1016/j.jconrel.2009.08.026
- Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28(9), 3916-3922.
- Chang, K. L., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2010). Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape. *Bioconjug Chem*, 21(6), 1087-1095. doi:10.1021/bc1000609
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering--a review. *Carbohydr Polym*, 92(2), 1262-1279. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028
- Corbet, C., Ragelle, H., Pourcelle, V., Vanvarenberg, K., Marchand-Brynaert, J., Preat, V., & Feron, O. (2016). Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: Identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. *J Control Release*, 223, 53-63. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.020
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), 701-703. doi:10.1126/science.223.4637.701
- de Fougérolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., & Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6(6), 443-453. doi:10.1038/nrd2310
- Doane, T. L., Chuang, C. H., Hill, R. J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle zeta -potentials. *Acc Chem Res*, 45(3), 317-326. doi:10.1021/ar200113c
- Dominska, M., & Dykxhoorn, D. M. (2010). Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci*, 123(Pt 8), 1183-1189. doi:10.1242/jcs.066399
- Dowdy, S. F. (2017). Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nat Biotechnol*, 35(3), 222-229. doi:10.1038/nbt.3802
- Feofilova, E. P., Usov, A. I., Mysyakina, I. S., & Kochkina, G. A. (2014). [Trehalose: chemical structure, biological functions, and practical application]. *Mikrobiologiia*, 83(3), 271-283.
- Fitzgerald, K., Kallend, D., & Simon, A. (2017). A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*, 376(18), e38. doi:10.1056/NEJMc1703361
- Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B. R., Strahs, A., Clausen, V., . . . Simon, A. (2017). A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*, 376(1), 41-51. doi:10.1056/NEJMoa1609243

- Fotin-Mleczech, M., Duchardt, K. M., Lorenz, C., Pfeiffer, R., Ojkic-Zrna, S., Probst, J., & Kallen, K. J. (2011). Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J Immunother*, 34(1), 1-15. doi:10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8
- Goodison, S., Urquidi, V., & Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*, 52(4), 189-196.
- Green, J. L., & Driggers, B. (1989). All visiting nurses are not alike: home health and community health nursing. *J Community Health Nurs*, 6(2), 83-93. doi:10.1207/s15327655jchn0602_4
- Haley, B., & Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*, 26(1), 57-64. doi:10.1016/j.urolonc.2007.03.015
- Hirosue, S., & Dubrot, J. (2015). Modes of Antigen Presentation by Lymph Node Stromal Cells and Their Immunological Implications. *Front Immunol*, 6, 446. doi:10.3389/fimmu.2015.00446
- Hoerr, I., Obst, R., Rammensee, H. G., & Jung, G. (2000). In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol*, 30(1), 1-7. doi:10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-#
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., . . . Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 4009-4017. doi:10.1182/blood-2006-04-015024
- Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *J Control Release*, 157(2), 297-304. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.023
- Horton, R. A., Moran, L.A. Scrimgeour, G., Perry, M., Rawn, D. (2006). *Principles of Biochemistry, 4th Edition* (4 ed.): Pearson.
- Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. O., . . . Kjems, J. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther*, 14(4), 476-484. doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010
- Hunter, A. C., & Moghimi, S. M. (2010). Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7), 1203-1209. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.03.026
- Ingram, V. M. (1956). A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, 178(4537), 792-794.
- Ito, T., Iida-Tanaka, N., & Koyama, Y. (2008). Efficient in vivo gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid. *J Drug Target*, 16(4), 276-281. doi:10.1080/10611860801900728
- Ito, T., Iida-Tanaka, N., Niidome, T., Kawano, T., Kubo, K., Yoshikawa, K., . . . Koyama, Y. (2006). Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer:

- protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional activation. *J Control Release*, 112(3), 382-388. doi:10.1016/j.jconrel.2006.03.013
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*, 18(1), 24-36. doi:10.1002/pro.3
- Ji, A. M., Su, D., Che, O., Li, W. S., Sun, L., Zhang, Z. Y., . . . Xu, F. (2009). Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology*, 20(40), 405103. doi:10.1088/0957-4484/20/40/405103
- Jirikowski, G. F., Sanna, P. P., Maciejewski-Lenoir, D., & Bloom, F. E. (1992). Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science*, 255(5047), 996-998.
- Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D. (2008). Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*, 16(11), 1833-1840. doi:10.1038/mt.2008.200
- Katyal, N., & Deep, S. (2014). Revisiting the conundrum of trehalose stabilization. *Phys Chem Chem Phys*, 16(48), 26746-26761. doi:10.1039/c4cp02914c
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(1), 3-11. doi:10.1016/j.addr.2009.09.004
- Kedmi, R., Ben-Arie, N., & Peer, D. (2010). The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*, 31(26), 6867-6875. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.027
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.036
- Kirby, B. J., & Hasselbrink, E. F., Jr. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, 25(2), 187-202. doi:10.1002/elps.200305754
- Knudsen, K. B., Northeved, H., Kumar, P. E., Permin, A., Gjetting, T., Andresen, T. L., . . . Roursgaard, M. (2015). In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine*, 11(2), 467-477. doi:10.1016/j.nano.2014.08.004
- Kogan, G., Soltes, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 29(1), 17-25. doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K. M., & Artursson, P. (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther*, 8(14), 1108-1121. doi:10.1038/sj.gt.3301492
- Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., . . . Sahin, U. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*, 534(7607), 396-401. doi:10.1038/nature18300

- Kubler, H., Scheel, B., Gnad-Vogt, U., Miller, K., Schultze-Seemann, W., Vom Dorp, F., . . . Stenzl, A. (2015). Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study. *J Immunother Cancer*, 3, 26. doi:10.1186/s40425-015-0068-y
- Kuhn, A. N., Diken, M., Kreiter, S., Selmi, A., Kowalska, J., Jemielity, J., . . . Sahin, U. (2010). Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Ther*, 17(8), 961-971. doi:10.1038/gt.2010.52
- Lallana, E., Rios de la Rosa, J. M., Tirella, A., Pelliccia, M., Gennari, A., Stratford, I. J., . . . Tirelli, N. (2017). Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery. *Mol Pharm*, 14(7), 2422-2436. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00320
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.029
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., . . . Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal*, 32(6), 1149-1158.
- Lechanteur, A., Furst, T., Evrard, B., Delvenne, P., Hubert, P., & Piel, G. (2016). PEGylation of lipoplexes: The right balance between cytotoxicity and siRNA effectiveness. *Eur J Pharm Sci*, 93, 493-503. doi:10.1016/j.ejps.2016.08.058
- Lins, R. D., Pereira, C. S., & Hunenberger, P. H. (2004). Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins*, 55(1), 177-186. doi:10.1002/prot.10632
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. O., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., . . . Kjems, J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.004
- Luo, Y., & Prestwich, G. D. (1999). Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjug Chem*, 10(5), 755-763.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 114(1), 100-109. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.014
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010). One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content. *Biomacromolecules*, 11(3), 549-554. doi:10.1021/bm901345q
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10(6), 1490-1499. doi:10.1021/bm900097s
- Malmö, J., Sorgard, H., Varum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *J Control Release*, 158(2), 261-268. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.012

- Manna, U., Bharani, S., & Patil, S. (2009). Layer-by-layer self-assembly of modified hyaluronic acid/chitosan based on hydrogen bonding. *Biomacromolecules*, 10(9), 2632-2639. doi:10.1021/bm9005535
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(1), 12-27. doi:10.1016/j.addr.2009.08.004
- Menzel, E. J., & Farr, C. (1998). Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett*, 131(1), 3-11.
- Merkel, O. M., Urbanics, R., Bedocs, P., Rozsnyay, Z., Rosivall, L., Toth, M., . . . Szebeni, J. (2011). In vitro and in vivo complement activation and related anaphylactic effects associated with polyethylenimine and polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Biomaterials*, 32(21), 4936-4942. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.035
- Mok, H., Park, J. W., & Park, T. G. (2007). Antisense oligodeoxynucleotide-conjugated hyaluronic acid/protamine nanocomplexes for intracellular gene inhibition. *Bioconjug Chem*, 18(5), 1483-1489. doi:10.1021/bc070111o
- Muzzarelli, R. A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar Drugs*, 8(2), 292-312. doi:10.3390/md8020292
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., & Faitelson, Y. (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39(6), 527-579. doi:10.1080/10408360290795574
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Mol Biotechnol*, 46(2), 182-196. doi:10.1007/s12033-010-9286-1
- Onishi, H., & Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20(2), 175-182.
- Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 307(1), 93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*, 17(4), 261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
- Perche, F., Benvegnu, T., Berchel, M., Lebegue, L., Pichon, C., Jaffres, P. A., & Midoux, P. (2011). Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine*, 7(4), 445-453. doi:10.1016/j.nano.2010.12.010
- Phua, K. K., Leong, K. W., & Nair, S. K. (2013). Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *J Control Release*, 166(3), 227-233. doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.029
- Probst, J., Weide, B., Scheel, B., Pichler, B. J., Hoerr, I., Rammensee, H. G., & Pascolo, S. (2007). Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther*, 14(15), 1175-1180. doi:10.1038/sj.gt.3302964
- Romberg, B., Hennink, W. E., & Storm, G. (2008). Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm Res*, 25(1), 55-71. doi:10.1007/s11095-007-9348-7

- Ruponen, M., Ronkko, S., Honkakoski, P., Pelkonen, J., Tammi, M., & Urtti, A. (2001). Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J Biol Chem*, 276(36), 33875-33880. doi:10.1074/jbc.M011553200
- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Schlake, T., Thess, A., Fotin-Mleczek, M., & Kallen, K. J. (2012). Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*, 9(11), 1319-1330. doi:10.4161/rna.22269
- Schroeder, A., Levins, C. G., Cortez, C., Langer, R., & Anderson, D. G. (2010). Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J Intern Med*, 267(1), 9-21. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02189.x
- Shim, M. S., & Kwon, Y. J. (2009). Acid-responsive linear polyethylenimine for efficient, specific, and biocompatible siRNA delivery. *Bioconjug Chem*, 20(3), 488-499. doi:10.1021/bc800436v
- Singer, M. A., & Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell*, 1(5), 639-648.
- Strand, S. P., Issa, M. M., Christensen, B. E., Varum, K. M., & Artursson, P. (2008). Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. *Biomacromolecules*, 9(11), 3268-3276. doi:10.1021/bm800832u
- Su, X., Fricke, J., Kavanagh, D. G., & Irvine, D. J. (2011). In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles. *Mol Pharm*, 8(3), 774-787. doi:10.1021/mp100390w
- Thess, A., Grund, S., Mui, B. L., Hope, M. J., Baumhof, P., Fotin-Mleczek, M., & Schlake, T. (2015). Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther*, 23(9), 1456-1464. doi:10.1038/mt.2015.103
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.010
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol Ther*, 18(10), 1787-1795. doi:10.1038/mt.2010.143
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., . . . Berneman, Z. N. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 98(1), 49-56.

- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release*, 151(3), 220-228. doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.004
- Williford, J. M., Wu, J., Ren, Y., Archang, M. M., Leong, K. W., & Mao, H. Q. (2014). Recent advances in nanoparticle-mediated siRNA delivery. *Annu Rev Biomed Eng*, 16, 347-370. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-105119
- Wittrup, A., Ai, A., Liu, X., Hamar, P., Trifonova, R., Charisse, K., . . . Lieberman, J. (2015). Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol*, 33(8), 870-876. doi:10.1038/nbt.3298
- Wittrup, A., & Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*, 16(9), 543-552. doi:10.1038/nrg3978
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1), 1465-1468.
- Wurtele, H., Little, K. C., & Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther*, 10(21), 1791-1799. doi:10.1038/sj.gt.3302074
- Xie, G., & Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys Chem*, 64(1-3), 25-43.
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*, 13(3), 1133-1174. doi:10.3390/md13031133
- Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G., & Szoka, F. C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta*, 1390(2), 119-133.