



Université de Strasbourg  
**FACULTE DE PHARMACIE**

N° d'ordre : .....

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-

**LES LIPIDES CATIONIQUES DANS LA VECTORISATION  
D'OLIGONUCLEOTIDES**

Présenté par Alicia Dirand

Soutenu le 6 novembre 2024 devant le jury constitué de

Professeur Vandamme Thierry, Président

Docteur Spanedda Maria-Vittoria, Directeur de thèse

Docteur Carlos William, Autres membres du jury

Approuvé par le Doyen et

Par le Président de l'Université de Strasbourg



# Liste des enseignants-chercheurs de la faculté de pharmacie de Strasbourg

<b>Doyen</b>	ESTHER KELLERBERGER
<b>Directeurs adjoints</b>	JULIEN GODET BRADICE HEURTALLET Emilie GEX
<b>Directeur adjoint étudiant</b>	Léo FERRIERE-ARTURIAUX

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

### Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Lise	BOUDEL	Chimie thérapeutique
Féral	BOUDEL	Biophysique
Said	ENKHAH	Chimie analytique
Valérie	SEDFROV	Microbiologie
Philippe	GEORGEL	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	GIS	Pharmacologie moléculaire
Matrice	HEURTALLET	Pharmacie galénique
Esther	KELLERBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHONNI	Chimie analytique
Franck	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Ves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PARIS	Droit économie pharm.
Françoise	POKE	Toxicologie
Valérie	SCHNE-HERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogénétique
Catherine	VICTARION	Pharmacogénétique
Rosal	WEHLE	Pharmacie galénique

### Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Bi chimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOCAS-SPRAL	immunologie
Geneviève	UREAUD-SÉDNER	Pharmacochimie

### Enseignants contractuels

Alexandre	CHAMPERT	Pharmacie d'officine
Mathieu	FOCHER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAT	Droit et économie pharm.
Philippe	SANSE	ingénierie pharmaceutique
Caroline	MULLER - WEHLE	Pharmacie d'officine

### Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTUN	Pharmacie biogénétique
Fareha	BATODI	Bi chimie
Marine	BERGANTÉLÉ	Chimie analytique
Elia	BOMBARDIA	Biophysique
Auréli	BOUDEROUY	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTART	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Mouala	CHREB	Pharmacie biogénétique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Naraila	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMORT	Biologie cellulaire
Guise	HAAR-ARTCHOUK	Plantes médicinales
Clém	JACQUEMARD	Chimie-informatique
Julie	KARPENKO	Pharmacochimie
Sonia	LÖNDEL	Chimie analytique
Claryse	MACHLINE	Chimie physique
Isabel	MATZ-WEITHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADI	Droite
Nathalie	NEDERHOFFER	Pharmacologie
Sergie	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacogénétique
Sylvie	PERDREY	Parasitologie
Humain	REUTSCH	Chimie en flux
Frédéric	REYVELLA	Biostatistiques
Fatima	NASSAM	Microbiologie
Elisabete	REAL	Bi chimie
Andreas	RESEN	Biophysique
Luizma	RIFALTI-VALDES	Analyse du médicament
Carole	RONGIANI	Toxicologie
Emilie	UCK	Pharmacologie
Isabela	SOCASOV	Pharmacogénétique
Marja-Victoria	SPANZODA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nazera	TOURD	Chimie physique
Auréli	URBAIN	Pharmacogénétique
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Marie	ZANOU	Chimio-génétique

### Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ETIENNE-SELLOUN	Pharmacologie - pharm. clinique

### Assistant hospitalier universitaire

Dahien	REITA	Bi chimie
--------	-------	-----------

# Serment de Galien



## SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit  
dans les préceptes de mon art et de  
leur témoigner ma reconnaissance en  
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,  
ma profession avec conscience et de respecter non  
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles  
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.



# Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de la réalisation de ma thèse. Un grand merci à ma directrice de thèse, Madame Spanedda, pour son encadrement, sa patience, sa réactivité et ses précieux conseils, qui ont été d'une aide inestimable et ont grandement contribué à l'aboutissement de ce projet.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des professeurs de la faculté de pharmacie de Strasbourg pour leurs enseignements de qualité et les connaissances qu'ils m'ont transmises durant mes années d'études. Je remercie tout particulièrement le Professeur Vandamme d'avoir accepté de présider ce jury et pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie également Docteur William Carlos qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et qui a su partager son expertise sur le sujet. Merci pour ton implication et ta bienveillance.

Un grand merci à mes amis du sang de l'artère : Elisabeth, Floriane, Gauthier, Guillaume, Justine, Marie, Victor et Virginie, pour leur soutien inconditionnel et tous les moments merveilleux partagés ensemble ; à l'AAEPS, qui m'a permis de m'intégrer et de trouver ma place au sein de la faculté ; et à mon ami Marc, sans qui mes deux dernières années d'étude auraient été bien plus difficiles. Merci tout particulièrement à toi, Arthur, qui m'as soutenue et encouragée tous les jours depuis 2018.

Je souhaite remercier ma famille, sans qui rien de ça n'aurait été possible. Merci à papa et maman pour m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même ; à Lucile et Mathéo pour me faire rire et me rendre heureuse ; et à mes grands-parents, mamie Pupuce et papy Fausto, qui n'ont cessé de croire en moi. Une pensée particulière pour papy Jacques et mamie Thérèse qui nous ont quittés cette année, je sais que vous attendiez ce jour tout particulièrement et que peu importe où vous vous trouvez, vous serez toujours très fiers de moi.

Enfin, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail. Merci du fond du cœur.



# Table des matières

Liste des abréviations .....	4
Liste des tableaux et figures .....	7
Introduction .....	9
I. Oligonucléotides .....	10
1. De l'ADN à la protéine .....	10
2. Différentes classes d'oligonucléotides .....	13
a. Oligonucléotides antisens .....	13
Oligonucléotides dépendants de la RNase H : les gapmers .....	14
Oligonucléotides stérique-bloquants : les ASO à commutation d'épissage .....	17
b. Aptamères .....	21
c. Petits ARN interférents .....	23
3. Modifications chimiques des oligonucléotides .....	27
II. Lipides cationiques dans la vectorisation .....	33
1. Structure d'un lipide .....	34
2. Composition des vecteurs lipidiques .....	38
a. Lipides cationiques .....	39
b. Lipides ionisables .....	40
c. Lipides auxiliaires .....	43
Phospholipides .....	43
Cholestérol .....	44
PEG .....	45
3. Différents types de vecteurs à base de lipides .....	47
a. Liposomes .....	47
Classification des liposomes en fonction de leur structure et leur taille .....	48
Classification des liposomes en fonction de leur composition .....	49
Liposomes conventionnels .....	50

Liposomes furtifs .....	50
Liposomes immunitaires .....	50
b. Lipoplexes .....	52
c. Nanoparticules lipidiques modernes .....	53
4. Méthodes de fabrication .....	55
a. Méthodes conventionnelles .....	55
Hydratation en couche mince .....	55
Injection d'éthanol .....	56
b. Nouvelles méthodes .....	56
Mélange à jonction T .....	56
Mélange microfluidique .....	57
III. Traitements utilisant les NPL modernes .....	59
1. Onpattro (patisiran) .....	59
a. La maladie : l'amylose à transthyrétine .....	59
Epidémiologie .....	59
Mutations .....	60
Symptômes .....	61
Diagnostic .....	62
Prise en charge .....	62
b. Le médicament : Onpattro (patisiran) .....	64
Modèle de L'Onpattro : NPL et ON utilisés .....	64
Mécanisme d'action .....	66
Etudes cliniques .....	67
2. Vaccins à ARNm contre le Covid-19 .....	69
a. La maladie : le Covid-19 .....	70
Epidémies à coronavirus .....	70
Virus : modèle et mécanisme d'action .....	71
Transmission, symptômes et diagnostic .....	73



b. Vaccins à ARNm contre le Covid-19 .....	74
Modèles des vaccins : NPL et ARNm utilisés .....	75
Mécanisme d'action .....	77
Avantages et inconvénients .....	78
Conclusion .....	80
Bibliographie .....	82

## Liste des abréviations

**2'-F** : 2'-fluoro

**2'-O-MOE** : 2'-O-méthoxyéthyle

**2'-OH** : 2'-hydroxyle

**2'-OMe** : 2'-O-méthyle

**5'-Me-C** : 5'-méthylcytosine

**A** : adénine

**AC** : anticorps

**ACE2** : enzyme de conversion de l'angiotensine 2

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**Ago2** : argonaute-2

**ALAS1** : delta-aminolévulinate synthase 1

**AMM** : autorisation de mise sur le marché

**AN** : acide nucléique

**ApoB / ApoC3** : apolipoprotéine B / C3

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNi** : ARN interférence

**ARNm** : ARN messenger

**ARNpm** : ARN pré-messenger

**ASO** : oligonucléotides antisens

**ATTR** : amylose à transthyréline

**C** : cytosine

**CD4+ / CD8+** : cluster de différenciation 4+ / 8+

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CMV** : cytomegalovirus

**CPA** : cellules présentatrices d'antigènes

**DC-Chol** : 3-β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]-cholestérol

**DLin-DMA** : 1,2-dilinoléoxy- N,N -diméthyl-3-aminopropane

**DLin-K-DMA** : 2,2-dilinoléyl-4-diméthylaminométhyl-[1,3]-dioxolane

**DLin-KC2-DMA** : 2,2-dilinoléyl-4-(2-diméthylaminoéthyl)-[1,3]-dioxolane

**DLin-MC3-DMA** : heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(diméthylamino)butanoate

**DMD** : dystrophie musculaire de Duchenne

**DMLA** : dégénérescence maculaire liée à l'âge

**DMRIE** : Dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthyl ammonium

**DODAP** : 1,2-dioléoyloxy-3-(diméthylamino)propane

**DOGS** : di-octadécylamido-glycyl-spermine

**DOPE** : 1,2-Dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine

**DOTAP** : 1,2-bis(oléoyloxy)-3-(triméthylammonio) propane

**DOTMA** : di-oléoyloxy-propyl-triméthylammonium

**DSPC** : 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

**DSPE** : distéaroyl-phosphatidyléthanolamine

**E** : protéine d'enveloppe

**EGCG** : épigallocatechine-3-gallate

**EMA** : Agence Européenne des Médicaments

**ERGIC** : compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi

**FDA** : Food and Drug Administration

**G** : guanine

**GalNAc** : N-acétylgalactosamine

**GO** : glycolate oxydase

**GUV** : vésicules unilamellaires géantes

**hATTR** : amylose héréditaire à transthyrétine

**IVT** : transcrits in vitro

**LB/LT** : lymphocytes B/T

**LDL** : lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)

**LNA** : acides nucléiques verrouillés (locked nucleic acid)

**LPL** : lipoprotéine lipase

**LUV** : grandes vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicle)

**M** : protéine membranaire

**MERS-CoV** : coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient

**MLV** : vésicules multilamellaires

**mNIS+7** : modification du score modifié de déficience neuropathique +7

**MVV** : vésicules multivésiculaires

**N** : protéine de nucléocapside

**NPL** : nanoparticule lipidique

**OMS** : organisation mondiale de santé

**ON** : oligonucléotides

**PCR** : réaction par polymérase en chaîne

**PCSK9** : proprotéine convertase subtilisine / kexine de type 9

**PEG** : polyéthylène glycol

**pKa** : constante de dissociation acide

**PMO** : oligomères morpholino phosphorodiamidate

**PS** : phosphorothioate

**RES** : système réticulo-endothélial

**RISC** : complexe de silençage induit par l'ARN (RNA induced silencing complex)

**S** : protéine de pointe

**SAINTs** : synthétique amphiphile interaction

**siARN** : petits ARN interférents (small interfering RNA)

**SMA** : amyotrophie spinale

**SMN1** : motoneurone de survie 1

**SNC** : système nerveux central

**SOD1** : superoxyde dismutase 1

**SARS-CoV** : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère

**SSO** : oligonucléotides à commutation d'épissage (splice switching oligonucleotides)

**SUV** : petites vésicules unilamellaires (small unilamellar vesicle)

**T** : thymine

**TTR** : transthyréine

**TUDCA** : acide tauro-ursodésoxycholique

**U** : uracile

**UTR** : région non traduites (untranslated regions)

**VEGF** : facteur de croissance endothélial vasculaire (vascular endothelial growth factor)

**WT** : protéine sauvage (Wild-Type)

## Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Caractéristiques de l'ADN et de l'ARN.

Tableau 2 : Différentes modifications apportées aux ON commercialisés.

Tableau 3 : Différents lipides cationiques selon la nature de leur tête.

Tableau 4 : Différents lipides cationiques selon la nature de leur queue hydrophobe.

Tableau 5 : Différents lipides cationiques selon la nature de leur linker.

Tableau 6 : Comparatif des différents Covids.

Figure 1 : Synthèse des protéines : de la transcription à la traduction.

Figure 2 : Mécanisme d'action des gapmers.

Figure 3 : Gapmers ayant été commercialisés.

Figure 4 : Mécanisme d'action des SSO.

Figure 5 : SSO ayant été commercialisés.

Figure 6 : Principe de reconnaissance conformationnelle des aptamères.

Figure 7 : Aptamère ayant été commercialisé.

Figure 8 : Mécanisme d'action des siARN.

Figure 9 : siARN ayant été commercialisés.

Figure 10 : Barrières biologiques empêchant l'activité thérapeutique des ON.

Figure 11 : Modifications chimiques courantes pour les ON ARN.

Figure 12 : Structures des modifications chimiques apportées aux ON.

Figure 13 : Schéma simplifié de la structure d'un lipide.

Figure 14 : Hypothèse de la structure moléculaire.

Figure 15 : Structure du DOTMA et DOTAP deux lipides cationiques.

Figure 16 : Formation de structures hexagonales.

Figure 17 : Structures chimiques des lipides ionisables.

Figure 18 : Effets des valeurs de pKa sur l'instabilité, la puissance et la toxicité des vecteurs lipidiques.

Figure 19 : Formes et structures chimiques des phospholipides et du cholestérol.

Figure 20 : Structure chimique de lipides-PEG.

Figure 21 : Représentation d'un liposome.

Figure 22 : Classification des liposomes en fonction de leur structure et leur taille.

Figure 23 : Représentation d'un liposome en fonction de ses trois générations.

Figure 24 : Différentes représentations de lipoplexes en fonction des publications.

Figure 25 : Représentation d'une NPL.

Figure 26 : Représentation de différentes méthodes de fabrication de vecteurs lipidiques.

Figure 27 : Mutation du gène TTR entraînant la formation de fibrilles amyloïdes.

Figure 28 : Les différents traitements de l'ATTR.

Figure 29 : Représentation de l'Onpattro et de ses composants.

Figure 30 : Mécanisme d'action du patisiran.

Figure 31 : Représentation du Covid-19.

Figure 32 : Cycle de réplication du coronavirus.

Figure 33 : Lipides ionisables et lipides-PEG composant les vaccins à ARNm contre le Covid-19.

Figure 34 : Mécanisme d'action des vaccins à ARNm.

# Les lipides cationiques dans la vectorisation d'oligonucléotides

## Introduction

Les oligonucléotides, petits fragments d'acides nucléiques, émergent en tant que nouvelle classe de produits thérapeutiques en raison de leur capacité à gérer des maladies autrefois incurables. Une quinzaine de médicaments utilisant des aptamères, petits acides ribonucléiques interférents et oligonucléotides antisens ont vu le jour depuis 1998 et utilisent divers processus tels que la modulation d'épissage, la dégradation de la cible par clivage médiée par RNase H et l'acide ribonucléase interférence pour moduler l'expression des gènes cibles.

Néanmoins, plusieurs limites empêchent le succès des oligonucléotides en clinique durant de nombreuses années. En effet, ils possèdent une courte demi-vie de circulation étant dégradés par les nucléases et détruits dans les compartiments endo-lysosomiaux. Leur capacité à atteindre la cible est également discutable, avec une incapacité à s'internaliser efficacement et à échapper aux endosomes. Enfin, ils peuvent provoquer des toxicités et des effets hors cibles.

Des modifications chimiques sur la nucléobase, la liaison phosphodiester et le sucre ribose sont apportées aux oligonucléotides, permettant ainsi leur commercialisation. Elles ne sont cependant pas suffisantes, entraînant le développement de vecteurs encapsulant les oligonucléotides. Dans un premier temps, les vecteurs viraux sont utilisés, puis sont remplacés par des vecteurs non viraux, moins toxiques.

Nous nous intéressons ici aux vecteurs non viraux utilisant des lipides. Différents types de vecteurs lipidiques sont créés au cours des dernières années avec les liposomes, lipoplexes et nanoparticules lipidiques modernes. Ils sont composés de lipides cationiques, ionisables, polyéthylène glycol, cholestérol et de phospholipides. Les lipides ionisables cationiques sont capables de modifier leur charge en fonction du pH et ainsi de réduire la toxicité, d'améliorer la demi-vie de circulation, de faciliter la libération de l'oligonucléotide et l'atteinte de la cible.

Cette encapsulation n'est cependant pas si simple et demande de nombreux travaux de construction, avec une composition à la fois favorable pour l'encapsulation et à la fois pour l'acheminement et la délivrance de l'oligonucléotide à la cible. Ces systèmes ont aujourd'hui fait leur preuve avec l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché pour l'Onpattro et les vaccins contre le Covid-19.

## I. Oligonucléotides

Les **oligonucléotides** (ON) sont de petits fragments d'acide nucléique (AN), simples ou doubles brins. Ils se lient à leur cible via l'appariement de bases Watson-Crick, permettant ainsi la **modulation de l'expression des gènes cibles** [1, 2]. Les ON synthétiques visent les gènes et produits géniques à l'aide de divers processus : **l'interférence par acide ribonucléique** (ARNi), la **modulation d'épissage**, la **dégradation** de la cible par clivage médiée par **RNase H**, l'activation de gènes ou encore l'édition programmée de gènes [3, 4, 5].

Les ON sont capables de cibler sélectivement n'importe quel gène [4], entraînant une diminution, augmentation ou restauration de l'expression des protéines [1, 2], permettant ainsi leur utilisation dans de nombreuses maladies. Plus de 15 médicaments utilisant des ON ont déjà été approuvés, visant des maladies du foie, du système nerveux central (SNC) et des muscles [5]. Différents types d'ON existent tels que les **aptamères**, les **petits ARN interférents** (siARN) et les **oligonucléotides antisens** (ASO) [2].

Cependant, l'administration d'ON aux organes et tissus cibles reste un défi majeur, limitant leur utilisation [5]. En effet, les ON peuvent être dégradés par des nucléases extracellulaires, filtrés par les reins, détruits dans le compartiment endolysosomal, ... [3]. De plus, les effets hors cibles et la toxicité sont à prendre en compte [4]. Pour surmonter ces problèmes, les **modifications chimiques** jouent un rôle crucial, permettant l'augmentation de l'activité et de la stabilité métabolique et de diminuer les effets hors cibles et l'immunogénicité [3, 5].

### 1. De l'ADN à la protéine

Pour comprendre le mode d'action des ON, il est intéressant d'observer le mécanisme de synthèse des protéines. Plusieurs étapes permettent la formation de celles-ci. Dans un premier temps, **l'acide désoxyribonucléique** (ADN) est transcrit en un **ARN pré-messager** (ARN<sub>pm</sub>), qui subit ensuite une maturation pour devenir un **ARN messager** (ARN<sub>m</sub>) mature capable de sortir du noyau et d'être ainsi **traduit en protéine**.

L'ADN est le support de l'information génétique contenue dans le noyau. Cette information génétique est constituée de gènes, fragments d'ADN caractérisés par la succession de nucléotides. L'ADN, double hélice de brins complémentaires, est composé de nucléotides à leur tour composés d'un sucre, d'un groupe phosphate et d'une base organique [6]. Il existe quatre bases différentes : l'adénine (A) complémentaire à la thymine (T) et la cytosine (C) complémentaire à la guanine (G), qui forment les



appariements de bases de Watson-Crick [6, 7]. Pour pouvoir sortir du noyau, l'information génétique doit être copiée en ARN. L'ARN est lui-même composé de nucléotides, mais quelques différences sont visibles entre celui-ci et l'ADN tel que le remplacement de la thymine par l'uracile (U) (*Tableau 1*) [8].

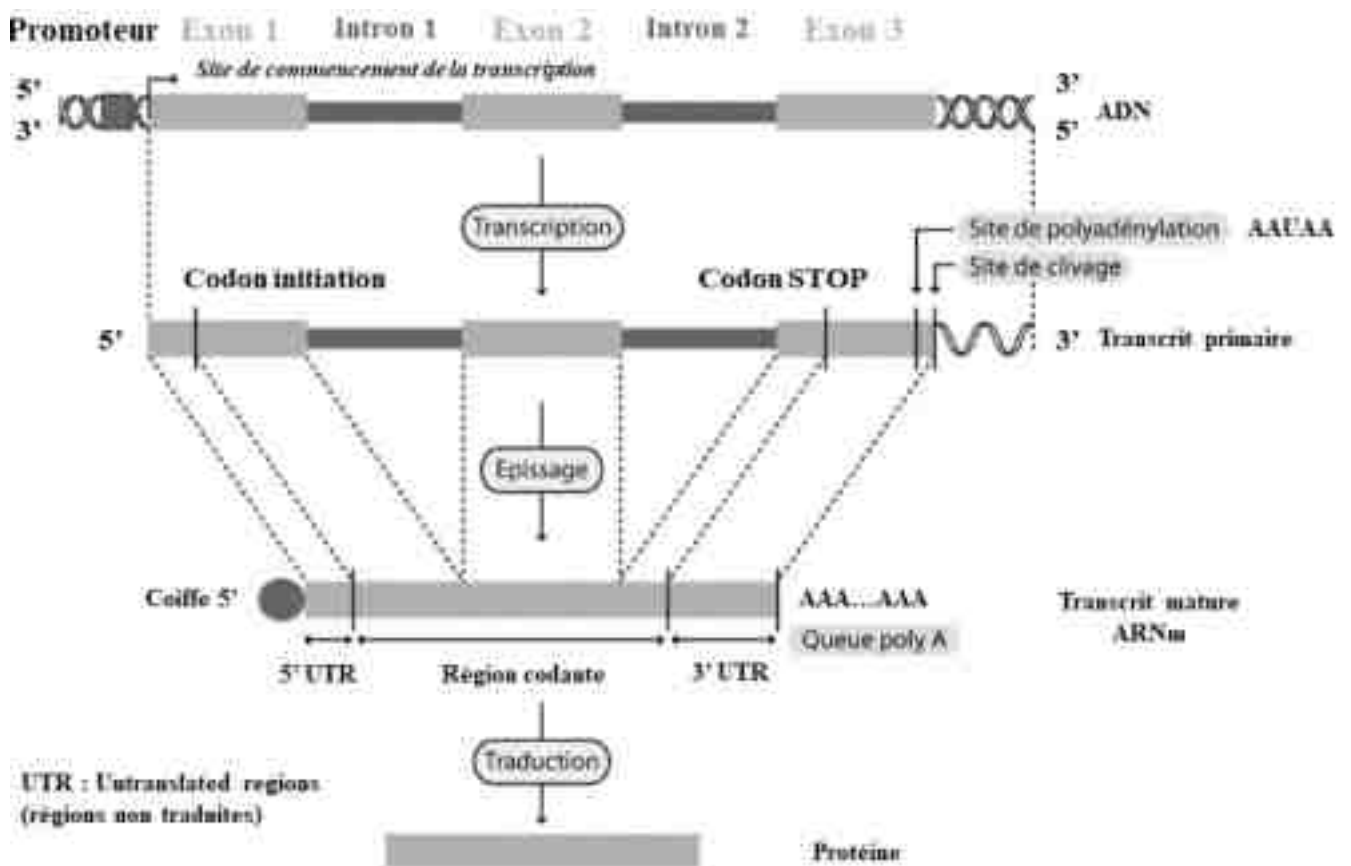
Caractéristiques	ADN	ARN
Hélices	Généralement double	Généralement simple
Sucre	Désoxyribose	Ribose
Bases	A, T, C, G	A, U, C, G
Longueur	Long : plusieurs millions de nucléotides	Court : au plus quelques milliers de nucléotides
Lieu	Noyau	Noyau + Cytoplasme

*Tableau 1 : Caractéristiques de l'ADN et de l'ARN. Observation de différences entre l'ADN et l'ARN [8].*

La **transcription** est la première étape de la synthèse des protéines. Elle permet de copier le matériel génétique de l'ADN en ARN et ainsi de sortir du noyau [6]. La transcription se divise elle-même en deux étapes : **la formation de l'ARN<sub>pm</sub>** et **sa maturation en ARN<sub>m</sub>** (*Figure 1*). Un promoteur détermine le site de début de la transcription. Ce promoteur permet le recrutement de l'ARN polymérase II, enzyme qui avec l'aide de nombreux cofacteurs protéiques forme un complexe d'initiation. La phase **d'initiation** est à l'origine de l'ouverture et du déroulement des deux brins d'ADN. Lors de la phase suivante, **l'élongation**, l'ARN polymérase II progresse le long du brin d'ADN matrice (antisens). Cela induit la synthèse d'un brin d'ARN<sub>pm</sub> complémentaire au brin antisens, et donc d'un ARN<sub>pm</sub> identique au brin codant (sens) de l'ADN. La complémentarité des bases azotées est ici utilisée. Enfin, lors de la phase de **terminaison**, des signaux mettent fin à la transcription, libérant ainsi l'ARN<sub>pm</sub>.

Cependant, cet ARN<sub>pm</sub> n'est pas viable, il doit subir une **phase de maturation**. Différentes modifications vont alors lui être apportées. Dans un premier temps, une **coiffe** en 5' lui est ajoutée (*Figure 1*). Elle permet de diminuer la réactivité de son extrémité et également d'éviter d'être reconnue et dégradée par les exonucléases. Une deuxième modification est réalisée avec **l'excision des introns**.

En effet, les gènes sont constitués d'une alternance d'introns (partie non codante du gène) et d'exons (partie codante du gène). Les introns et exons sont intégralement copiés dans l'ARNpm, la phase d'excision provoque le retrait de ces introns. Par la suite, un **épissage** a lieu, entraînant la réunion bout à bout des exons restants (*Figure 1*). L'épissage peut être **alternatif**, c'est-à-dire que différents exons peuvent se lier entre eux et ainsi créer des ARNm différents à partir du même ARNpm. Enfin, une **queue polyA** d'environ 200 nucléotides est ajoutée en 3' (*Figure 1*) [9]. Ceci permet de ralentir l'action des RNases (ribonucléase catalysant la dégradation de l'ARN) et donc d'augmenter l'espérance de vie et la stabilité de l'ARNm [10].



*Figure 1 : Synthèse des protéines : de la transcription à la traduction. Le brin d'ADN est transcrit en ARNpm à partir d'un site promoteur. Un épissage pour supprimer les introns et placer les exons bout à bout est réalisé. D'autres modifications sont apportées avec l'ajout de la coiffe en 5' et de la queue polyA en 3' afin d'obtenir un ARNm mature. Pour finir, cet ARNm est traduit en protéine [10].*

L'ARNm porte désormais l'information génétique. Il sort du noyau par les pores de la membrane nucléaire et peut ainsi être **traduit en protéine** au sein du cytoplasme [9]. Une protéine correspond à une séquence d'acides aminés, et une séquence de trois nucléotides d'ARNm, nommée codon, code pour

un acide aminé [6]. L'ARNm sert de plan pour placer les acides aminés dans l'ordre requis. Pour la réalisation de la traduction, des ribosomes, des ARN transporteurs, des codons initiateurs (AUG) et des codons stop (UAA, UAG, UGA) sont nécessaires. La traduction débute au niveau du codon initiateur, suivie d'une étape d'élongation avec le déplacement du ribosome le long de l'ARNm jusqu'au codon stop [10]. Les protéines formées pourront ensuite avoir de nombreux rôles tels qu'un rôle de transporteur (hémoglobine), structural (collagène), de défense immunitaire (immunoglobulines) et d'hormones protéiques (insuline) [11].

## 2. Différentes classes d'oligonucléotides

Les ON sont de courtes séquences d'AN synthétiques, contenant une vingtaine de nucléotides, capables de cibler l'ADN et l'ARN [6]. Ils peuvent en effet se lier avec **spécificité** et **affinité** aux séquences d'ARN, qu'il s'agisse d'ARNpm, d'ARNm, de protéines ribonucléiques ou bien de micro-ARN. Les ON se divisent en différentes classes, en fonction de leur mécanisme d'interaction avec la cible [12]. La première classe à avoir été développée est celle des **ASO**, suivie des **aptamères** et enfin des **siARN** [13]. Ces ON thérapeutiques traitent des maladies génétiques graves qui étaient autrefois incurables [14]. En 1998, le tout premier médicament à base d'ON, le **fomivirsen**, est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), puis par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA). Depuis, une quinzaine d'autres médicaments contenant des ON ont été produits avec 10 ASO, 5 siARN et 1 aptamère [5]. Nous aborderons ici les classes d'ON les plus courantes.

### a. Oligonucléotides antisens

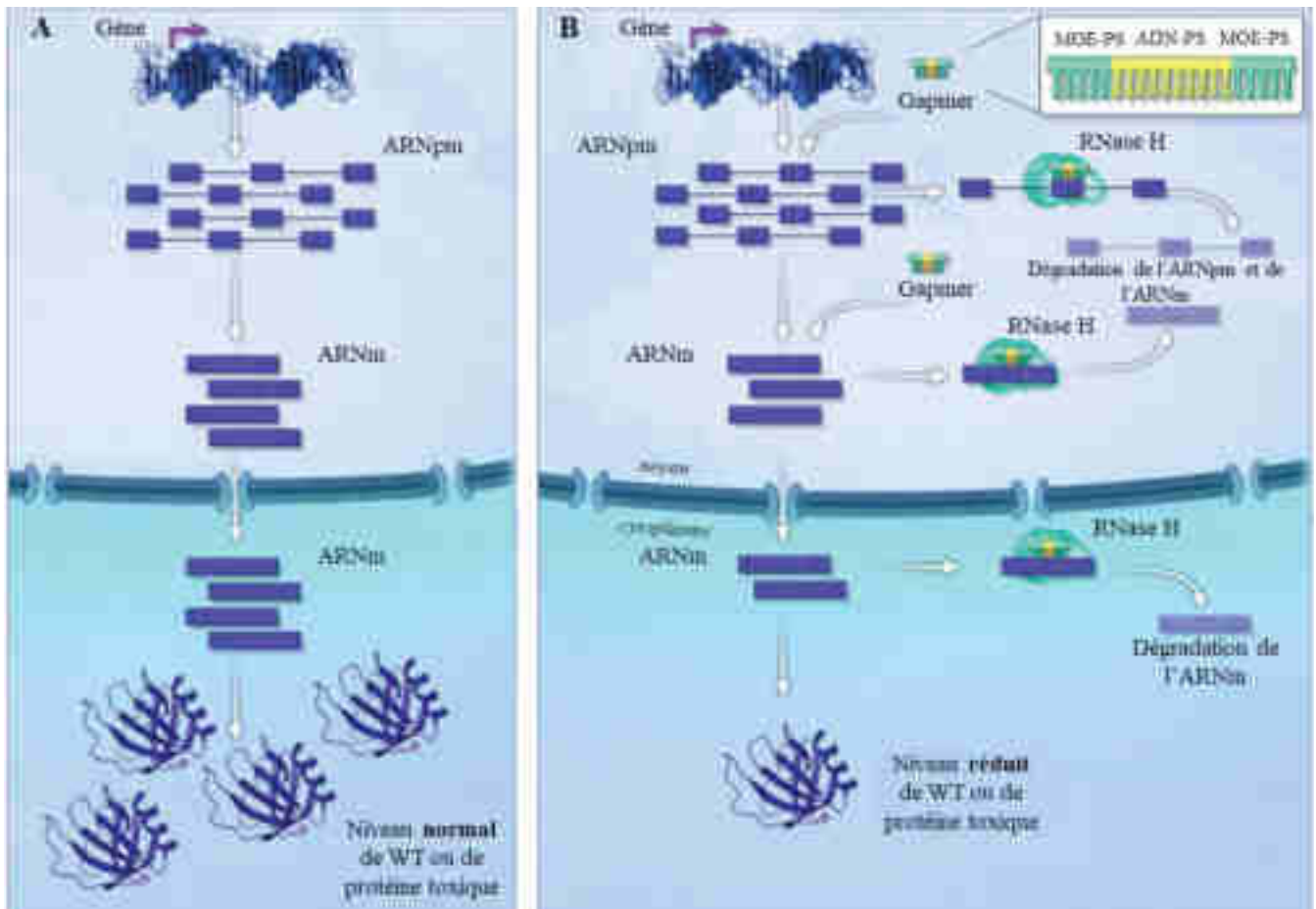
Les **ASO** sont les tous premiers ON à être développés. Ils ont été utilisés pour la première fois en 1978 par **Zamecnik et Stephenson** sur des cellules dans le but d'inhiber le cycle du virus de sarcome de Rous [15, 16, 17]. 20 ans plus tard, le **fomivirsen** est commercialisé. Aujourd'hui, ce sont les ON thérapeutiques prédominants sur le marché [16].

Les ASO se lient à un ARN cible via la complémentarité Watson-Crick et modifient son activité à l'aide de différents mécanismes [16, 18]. Ils peuvent être classés en deux grandes catégories : les ON **dépendants de la RNase H** et les ON **stérique-bloquants**. Ils peuvent alors dégrader l'ARN, altérer l'épissage, inhiber la traduction, perturber les interactions ARN-protéines, ... [19].

### ◆ Oligonucléotides dépendants de la RNase H : les gapmers

Les **gapmers** sont des ON synthétiques, monocaténaire, mesurant généralement 16 à 20 nucléotides [14]. Ils possèdent une région centrale de 6 à 10 nucléotides d'ADN, flanquée à chaque extrémité de 3 à 5 nucléotides contenant des modifications [12]. Ces nucléotides chimiquement modifiés permettent une meilleure hybridation et une résistance aux nucléases [16]. La région centrale d'ADN permet quant à elle le recrutement de la **RNase H** [15]. La RNase H est une endonucléase située dans le noyau et le cytoplasme capable de reconnaître l'hétéroduplex ARN/ADN et ainsi de réduire l'expression des gènes par clivage de l'ARN cible (*Figure 2*) [6, 20].

La région centrale d'un gapmer est complémentaire à une séquence d'ARNm ou ARNpm cible [17]. Cela lui permet de s'y lier de manière spécifique par appariement de bases Watson-Crick, formant alors un hybride ARN/ADN double brin [12, 14]. La formation de cet hybride entraîne le recrutement de la RNase H capable de cliver une liaison phosphodiester d'une molécule d'ARN et ainsi de **dégrader l'ARN** cible dans le noyau et le cytoplasme (*Figure 2*) [18, 21]. Ces hybrides imitent les hybrides ARN/ADN qui se produisent naturellement lors de la réplication de l'ADN, reconnus et clivés par la RNase H. La dégradation de l'ARN provoque une **diminution de la production de protéines** sauvages et mutantes au sein du cytoplasme (*Figure 2*) [14].



*Figure 2 : Mécanisme d'action des gapmers A. De la transcription à la traduction d'une protéine sauvage (Wild-Type (WT)) ou mutante à partir d'un gène. B. Gapmer avec sa structure chimique typique (modifications 2'-O-méthoxyéthyle (MOE) et phosphorothioate (PS)), conduisant à la formation d'un hybride ARN/ADN. Liaison à un exon dans l'ARNpm et dans l'ARNm. Recrutement de la RNase H qui reconnaît l'hybride et clive l'ARN. Le clivage entraîne la dégradation de l'ARN et donc une réduction de la production de protéines sauvages ou mutantes [14].*

Le premier gapmer commercialisé est le **Vitravene (fomivirsen)** (Figure 3), approuvé par la **FDA** en 1998 et par l'**EMA** en 1999. Il était utilisé dans le traitement de rétinites à cytomégalovirus (CMV) chez les patients atteints de SIDA [12]. Cet ASO cible l'ARNm codant la protéine CMV (IE)-2 nécessaire à la réplication virale, pour cela, il était directement injecté dans l'humeur vitrée. Il a cependant été retiré du marché, en 2002 en Europe et en 2006 aux Etats-Unis, les cas de rétinite à CMV devenant de plus en plus rares [13].

En 2013, le **Kynamro (mipomersen)** (Figure 3) est approuvé par la FDA et commercialisé aux Etats-Unis [3]. Il est indiqué dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote, maladie héréditaire rare et grave [14]. Elle est causée par des **mutations de perte de fonction** dans les gènes du

récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL), conduisant à une réduction de l'absorption hépatique du cholestérol LDL plasmatique [13]. L'ASO fusionne avec la région codante de l'ARNm de l'apolipoprotéine B (ApoB), composant essentiel des LDL, permettant la réduction des niveaux de protéines ApoB et donc des niveaux de LDL [14, 22]. L'EMA refuse cependant sa commercialisation, pour cause d'effets indésirables tels qu'une toxicité hépatique, un risque cardiovasculaire et un risque de stéatose hépatique [13].

En 2018, le **Tegsedi (inotersen)** (*Figure 3*) est approuvé par la FDA et l'EMA. Il est utilisé dans le traitement de l'amylose à transthyrétine (ATTR) et est administré par injections sous cutanées. L'ATTR est due à des **mutations** dans le gène transthyrétine (TTR), conduisant à des dépôts tissulaires de fibrilles amyloïdes créant des lésions organiques. Ces lésions sont responsables de cardiomyopathie, de polyneuropathie, de néphropathie et de dysfonctionnement gastro-intestinal [14]. L'inotersen est conçu pour cibler l'ARNm TTR, s'y lier et le dégrader, inhibant ainsi sa production hépatique [6, 17]. Il a permis une amélioration de la qualité de vie des patients atteints d'ATTR, cependant des effets indésirables sont visibles tels qu'une glomérulonéphrite et une thrombocytopénie [17].

En 2019, le **Waylivra (volanesorsen)** (*Figure 3*) est commercialisé pour le traitement du syndrome d'hyperchylomicronémie familiale. C'est une maladie caractérisée par une hypertriglycéridémie majeure associée à un risque élevé de pancréatite [23]. Elle est due à des **mutations récessives du gène** de la lipoprotéine lipase (LPL) (enzyme dégradant les triglycérides), entraînant une activité réduite ou absence de celle-ci. Le volanesorsen permet une réduction des niveaux d'ARNm de l'ApoC3 induisant une dégradation des triglycérides via une voie indépendante des LPL [14, 23]. L'ASO est injecté par voie sous-cutanée et nécessite un suivi de la numération plaquettaire pour prévenir la survenue de thrombocytopénie [23].

Un tout nouvel ASO, nommé **Qalsody (tofersen)** (*Figure 3*), a reçu une approbation accélérée de la FDA le 25 avril 2023. Il est utilisé dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique [24]. C'est une maladie neurodégénérative progressive et potentiellement mortelle affectant les motoneurons du cerveau et de la moelle épinière [25]. Il est administré par voie intrathécale [26] et est utilisé chez les patients présentant des **mutations** au niveau du gène de la superoxyde dismutase 1 (SOD1) [24]. Ce gapmer est capable de dégrader l'ARNm de la SOD1 et ainsi de réduire le niveau de protéine SOD1. Les résultats de l'étude clinique de phase III sont complexes, car le critère d'évaluation principal n'a pas montré de résultats statistiquement significatifs, mais les critères secondaires étaient en faveur du traitement [26]. Des essais en cours continuent d'évaluer les avantages cliniques du médicament, qui n'a pas encore été prouvé de manière concluante comme étant cliniquement bénéfique [25].

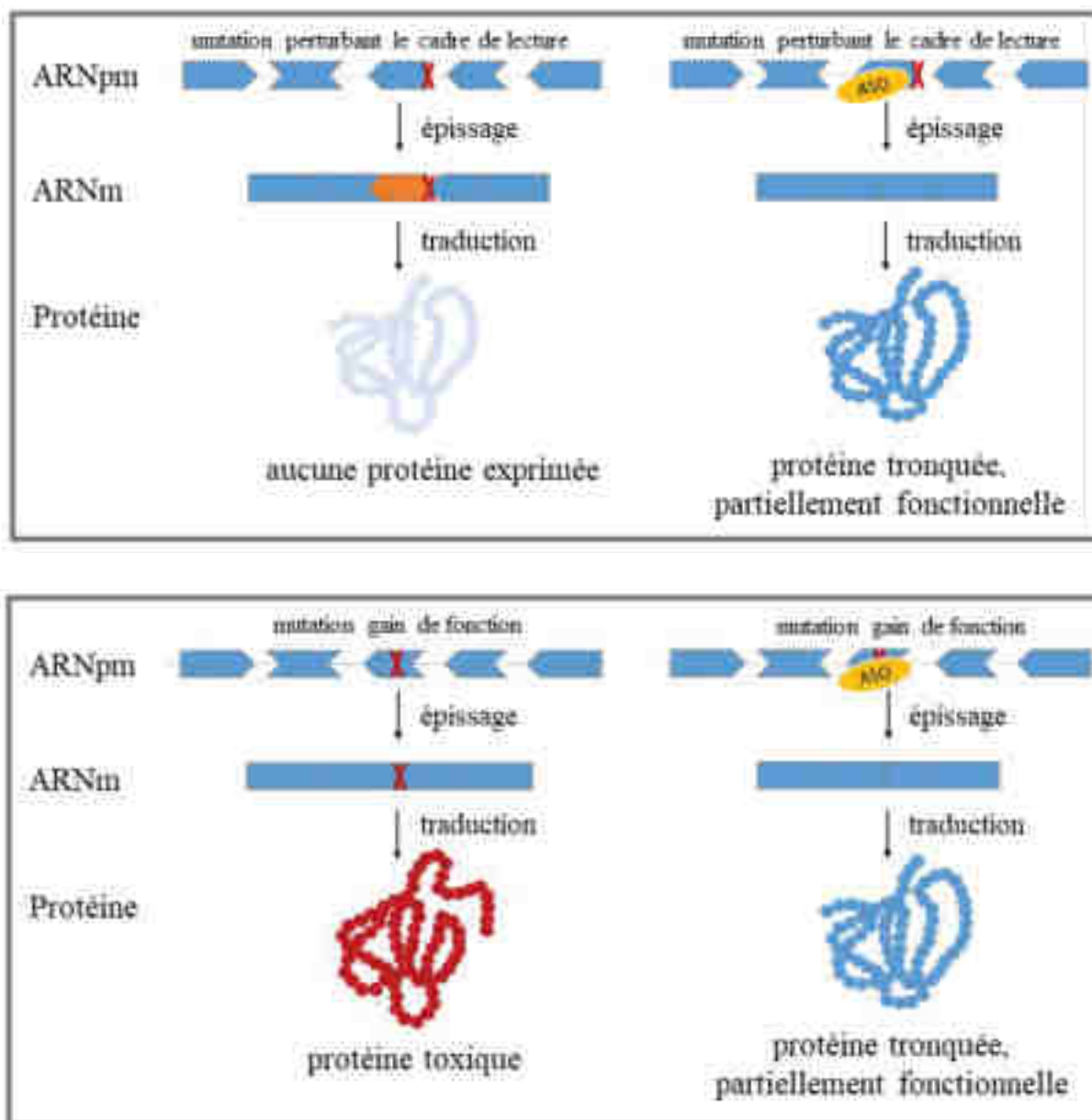


*Figure 3 : Gapmers ayant été commercialisés : Vitravene [27], Kynamro [28], Qalsody [29], Tegsedi [30], Waylivra [31].*

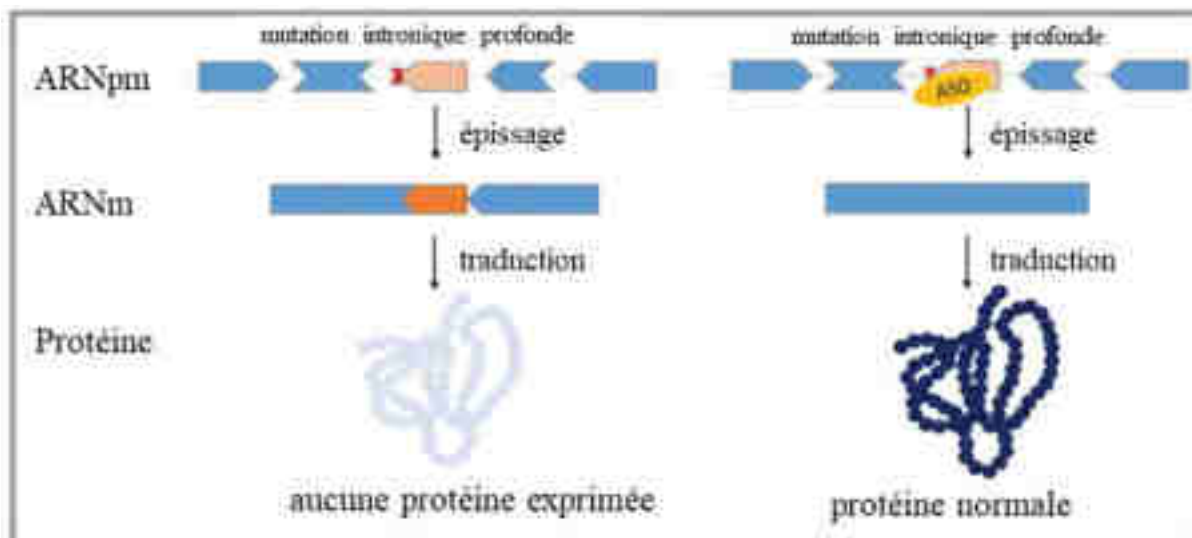
◆ **Oligonucléotides stérique-bloquants : les ASO à commutation d'épissage**

Les ASO à **commutation d'épissage**, appelés « **splice switching ON** » (SSO), apparaissent pour la première fois dans les années 90 [12]. Ce sont des ON synthétiques entièrement modifiés, simple brin, mesurant entre 15 et 30 nucléotides. Ces ASO sont absorbés par les cellules du SNC, des reins, des poumons, des glandes surrénales, du foie, des yeux et des muscles [14]. Environ 10% des maladies génétiques humaines sont dues à des mutations qui provoquent des défauts d'épissage de l'ARNpm [18].

Les SSO se lient à l'ARNpm dans le noyau, ciblant les introns, les exons ou les éléments régulateurs d'épissage [16, 20]. Ils peuvent alors **bloquer stériquement** la liaison des facteurs d'épissage à leurs sites cibles, modulant ainsi l'épissage [18, 32]. Ces ASO stérique-bloquants peuvent exclure spécifiquement (saut d'exon) ou retenir (inclusion d'exon) un ou plusieurs exons (*Figure 4*) [19, 33]. Cela permet de **corriger l'épissage**, de **restaurer le cadre de lecture**, d'**éliminer les mutations** faux sens, de **supprimer un codon stop** précoce ... [32, 34]. Des ARNm alternatifs sont alors produits, permettant la production d'une protéine tronquée avec une fonction partielle et donc la restauration de l'expression des protéines (*Figure 4*) [19, 35]. Sans l'intervention des SSO des protéines toxiques ou non fonctionnelles sont produites (*Figure 4*) [35].







*Figure 4 : Mécanisme d'action des SSO. **Panneau supérieur** : Des mutations non-sens peuvent conduire à la génération d'un codon stop précoce, empêchant la production de protéine. Le SSO peut entraîner un saut d'exon permettant de restaurer le cadre de lecture. Cela induit la formation de protéines tronquées avec une fonction partielle. **Panneau du milieu** : Un gain de fonction à lieu dans l'ARNm induisant la production d'une protéine toxique. Le SSO peut aussi ici sauter un exon, afin d'obtenir une protéine plus courte mais non toxique. **Panneau inférieur** : Inclusion d'un intron dans l'ARNm, provoquant un changement du cadre de lecture, empêchant la production de la protéine. L'ASO peut ici aussi restaurer le cadre de lecture et donc la production de protéines [35].*

**Spinraza (nusinersen)** (Figure 5) est le premier SSO commercialisé en 2016 par la FDA et en 2017 par l'EMA [14]. Il est utilisé dans le traitement de l'amyotrophie spinale (SMA), maladie neuromusculaire autosomique récessive rare, causée par des **mutations avec perte de fonction** dans le gène du motoneurone de survie 1 (SMN1) [36]. La SMA est caractérisée par une perte progressive des motoneurons, entraînant une atrophie musculaire et une perte de la fonction musculaire [35]. La mutation du gène SMN1 entraîne la production d'une protéine SMN non fonctionnelle [18]. Sur le plan embryonnaire, la perte complète de la protéine SMN est mortelle [35]. Un gène SMN homologue, nommé SMN2, est présent chez l'Homme. Il est capable de produire des protéines SMN fonctionnelles, mais seulement en faibles quantités [19, 37]. Cela est dû à une substitution nucléotidique silencieuse au sein de son exon 7, exon alors mal reconnu, et donc majoritairement non inclus au sein de l'ARNm final. Le saut de l'exon 7 conduit à une protéine instable, peu fonctionnelle [14, 35]. La sévérité de la maladie est corrélée au nombre de copies de SMN2 [36]. Il est donc intéressant de cibler SMN2 afin d'augmenter la quantité de SMN produites [37]. Le but est de favoriser l'inclusion de l'exon 7 lors de l'épissage de l'ARNpm du SMN2 [18]. Nusinersen se lie à l'intron 7 de l'ARNpm et y bloque un site d'épissage

interne [14], provoquant ainsi l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARNm de SMN2 et donc l'augmentation des niveaux de protéines fonctionnelles [13]. Le nusinersen est administré par voie intrathécale, ce qui permet de cibler le SNC [35].

D'autres SSO ont été développés pour traiter la dystrophie musculaire génétique la plus fréquente : la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) [34]. Cette maladie est causée par des mutations du gène DMD qui perturbent le cadre de lecture de l'ARNm, donnant lieu à des protéines dystrophines non fonctionnelles. Ces protéines dystrophines sont impliquées dans le soutien de la fibre musculaire [16][38]. Le manque de protéines entraîne une atrophie musculaire, une perte de la déambulation, une déficience respiratoire, une cardiomyopathie et une mort prématurée [34]. La stratégie thérapeutique envisagée consiste à exclure l'exon contenant la mutation afin de restaurer le cadre de lecture et d'obtenir une protéine incomplète mais partiellement fonctionnelle [16]. Le premier SSO approuvé pour la DMD est **Exondys 51 (eteplirsén)** (*Figure 5*). Il obtient une approbation accélérée de la FDA en 2016 [14]. Il permet de sauter l'exon 51 et peut être utilisé dans le traitement de 13% des patients atteints de DMD [19]. Il n'a cependant pas été approuvé par l'EMA en 2019 à cause d'un manque d'efficacité. Le **Vyondys 53 (golodirsén)** et **Viltepso (viltolarsén)** (*Figure 5*) sont approuvés par la FDA en 2019 et 2020, respectivement. Ils permettent de sauter l'exon 53 et peuvent être utilisés dans le traitement de 8% des patients [14]. Enfin, **Amondys 45 (casimersén)** (*Figure 5*) a reçu son approbation en février 2021 par la FDA pour le traitement de la DMD et permet le saut de l'exon 45 [39].

Enfin, des traitements « **N of one** », c'est-à-dire pour un seul et unique patient, peuvent être réalisés avec les ASO. C'est le cas du **Milasen**, utilisé dans le traitement de la lipofuscinose céréoïde neuronale 7, également nommée maladie de Batten [40]. C'est une maladie neurodégénérative rare et mortelle caractérisée par des symptômes progressifs entraînant une cécité, un retard de développement, une ataxie, des convulsions... La patiente traitée par le Milasen possédait une mutation intronique du gène MFSD8, protéine membranaire lysosomale, conduisant à un épissage aberrant et à l'introduction d'un codon stop prématuré [14, 41]. Milasen permet d'aboutir à un épissage normal et à la production de protéines, induisant une baisse de la fréquence et de la durée des convulsions, ainsi qu'un déclin fonctionnel plus lent. Cependant, la patiente avait des dommages neuronaux trop importants, non réversibles, et est malheureusement décédée 3 ans plus tard [41].

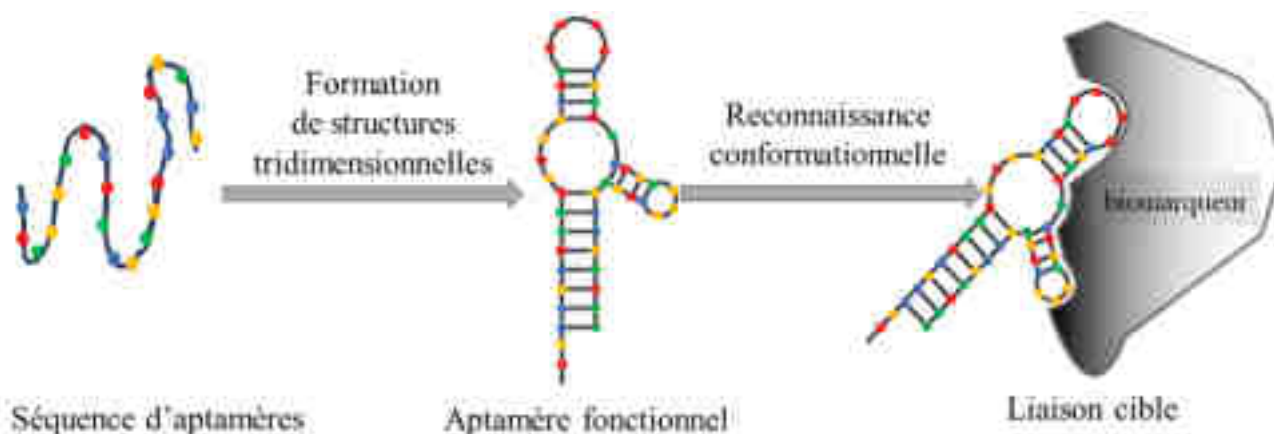


Figure 5 : SSO ayant été commercialisés : Spinraza [42], Vyondys 53 [43], Amondys 45 [44], Viltepso [45], Exondys 51 [46].

## b. Aptamères

Les **aptamères** sont des molécules d'ADN ou d'ARN simple brin qui se lient spécifiquement à une molécule complémentaire telles que les protéines, les peptides, les ions, les bactéries et les virus, avec une affinité et spécificité élevées [47, 48]. Ils se replient dans une conformation tridimensionnelle, leur permettant de se lier à leur cible, de **façon similaire aux anticorps** [49] (Figure 6). Les aptamères

mettent en œuvre différentes structures tridimensionnelles telles que des **boucles en épingle à cheveux**, des « **kissing complexes** » et des **quadruplexes** [50]. Leur nature flexible leur permet de s'enrouler autour d'une petite molécule ou de s'insérer dans des fentes et des interstices à la surface de molécules beaucoup plus grandes (*Figure 6*) et ainsi de moduler leur activité en tant que ligand [51]. Ils possèdent des avantages par rapport aux anticorps : une petite taille (meilleure pénétration tissulaire), une stabilité élevée, une faible immunogénicité, une bonne biocompatibilité, une sélection et production simple et rapide, une facilité de modification, une production à grande échelle et à faible coût avec une bonne reproductibilité et fiabilité [16, 52]. De plus, ils peuvent être rapidement désactivés par ajout d'un brin antidote complémentaire, les empêchant ainsi d'inhiber la protéine cible [12, 16]. En 1990, **Tuerk et Gold** montrent pour la première fois que les aptamères sont capables de se lier à une protéine virale empêchant alors sa réplication [49, 52]. Ils sont utilisés dans le diagnostic et en tant qu'agent thérapeutique dans les maladies infectieuses, l'oncologie, les maladies vasculaires, ... [49, 50].



*Figure 6 : Principe de reconnaissance conformationnelle des aptamères. Les séquences d'aptamères se replient en conformation tridimensionnelle, leur permettant de se lier à leur cible, formant ainsi un complexe aptamère-cible [53].*

Le **Macugen (pegaptanib)** (*Figure 7*) est le **premier et seul aptamère commercialisé**. Il est approuvé par la FDA en 2004 et par l'EMA en 2006 dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [13]. C'est un aptamère d'ARN de 28 nucléotides, injecté par voie intravitréenne, qui se lie au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Le VEGF induit une angiogenèse, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une hémorragie intraoculaire et une inflammation après liaison à ses récepteurs, conduisant à une forme néovasculaire de la DMLA [47, 51]. La DMLA est l'une des principales causes de baisse de vision chez les personnes âgées dans les pays développés, la forme néovasculaire correspond à 10% des DMLA [48]. Le Macugen cible un des isoformes du VEGF, le

VEGF165, afin d'inhiber son activité et de réduire la perte de vision [50]. Cependant, avec l'apparition des médicaments anticorps qui reconnaissent davantage d'isoformes du VEGF tel que le Lucentis (ranibizumab), ses ventes ont chuté à partir de 2011 [48, 49]. Il a malgré tout permis d'ouvrir la voie aux traitements anti-angiogénèse intraoculaire et a validé un traitement à base d'aptamère [49].



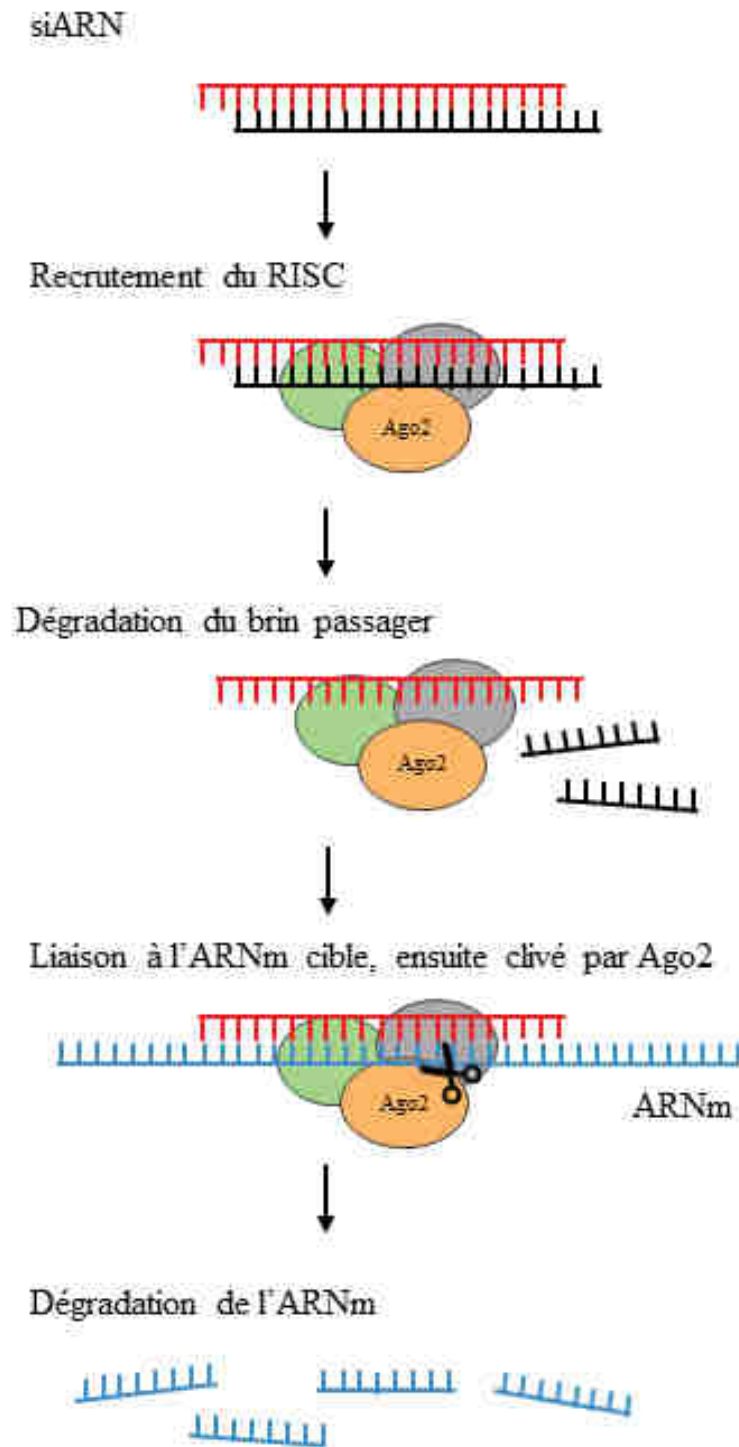
*Figure 7 : Aptamère ayant été commercialisé : Macugen (pegaptanib) [54].*

### c. Petits ARN interférents

Les **siARN** sont des ON d'ARN double brin de 20 à 25 paires de bases [55]. Ils sont utilisés pour **réguler négativement l'expression des gènes** et ainsi **bloquer la synthèse des protéines pathogènes**. Pour cela, ils utilisent le mécanisme d'ARNi, nommé **silencage génique** [20], permettant de réduire au silence l'expression de gènes. Ce mécanisme a été découvert en 1998 par **Andrew Fire** et **Craig Mello**, qui ont par la suite obtenu le **prix Nobel** de physiologie ou médecine en 2006 [15, 16, 17]. Le mécanisme d'ARNi utilise un ARN double brin court, contenant un brin passager (sens) et un brin guide (antisens), afin de dégrader l'ARNm [20]. Le brin guide est complémentaire de la séquence cible de l'ARNm [56].

Les siARN sont reconnus et incorporés dans le **complexe de silencage induit par l'ARN** (RISC). Le brin guide est chargé dans le RISC tandis que l'autre brin est rejeté et dégradé (*Figure 8*) [17]. Ce brin antisens permet de guider RISC vers l'ARNm cible [12]. RISC peut alors se lier spécifiquement à la séquence cible de l'ARNm par appariement de bases complémentaires, et **Argonaute-2** (Ago2), endonucléase clé du RISC, peut ainsi cliver l'ARNm [48]. L'ARNm est alors dégradé (*Figure 8*). Les

siARN peuvent être utilisés dans le traitement de nombreuses maladies telles que le cancer, les infections virales et les maladies neurodégénératives [17].



*Figure 8 : Mécanisme d'action des siARN. Le siARN se lie au RISC. Le brin passager est dégradé. La complémentarité du brin guide avec l'ARNm cible permet de s'y lier. Ago2 clive l'ARNm qui est alors dégradé [18].*

Le tout premier traitement ARNi et premier siARN, approuvé par la FDA et l'EMA en 2018, est **l'Onpattro (patisiran)** (*Figure 9*). Il est utilisé pour le traitement de l'ATTR héréditaire (hATTR) chez l'adulte. Des mutations du gène TTR sont à l'origine de cette maladie [16]. Elles entraînent un mauvais repliement des protéines TTR, synthétisée dans le foie, qui se déposent sous forme amyloïde au niveau de tissus et d'organes tels que le cœur, les reins et les nerfs [48]. Ces dépôts entraînent des cardiomyopathies et polyneuropathies [57]. Le patisiran est administré par voie intraveineuse et est formulé dans une **nanoparticule lipidique** (NPL). Il cible une séquence conservée dans la région 3' non traduite des transcrits TTR de type sauvage et mutant [18]. Sa liaison à l'ARNm du TTR provoque sa dégradation, empêchant alors la synthèse des protéines [57]. Ce médicament sera traité plus en détail au cours de la partie III.

D'autres siARN ont pu ensuite voir le jour : le givosiran, le lumasiran, l'inclisiran et le vutrisiran. Comme le patisiran, ils ciblent tous le foie, cependant ils ne sont pas encapsulés dans une NPL mais conjugués à la **N-acétylgalactosamine** (GalNAc). La conjugaison au GalNAc permet une administration ciblée aux hépatocytes [58].

Le **Givlaari (givosiran)** (*Figure 9*) est approuvé par la FDA en 2019 et l'EMA en 2020. Il est indiqué dans le traitement de la porphyrie aiguë intermittente, maladie causée par la mutation d'une enzyme au sein de la voie de biosynthèse de l'hème hépatique [59]. Des molécules de porphyrines toxiques se forment, s'accumulent, entraînant des crises neuroviscérales potentiellement mortelles [48]. Le givosiran cible la delta-aminolévulinate synthase 1 (ALAS1), première enzyme de la voie de synthèse de l'hème [60]. Il se lie à l'ARNm de ALAS1 afin d'inhiber la traduction et l'expression de la protéine [59]. Cela empêche l'accumulation des protéines toxiques associées aux crises [58].

En 2020, l'EMA et la FDA approuvent **l'Oxlumo (lumasiran)** (*Figure 9*) pour le traitement de l'hyperoxalurie primaire, maladie caractérisée par une sécrétion élevée d'oxalate. L'augmentation conduit à la cristallisation de l'oxalate de calcium et son accumulation, provoquant une inflammation et une fibrose tissulaire conduisant par la suite à une lithiase urinaire, une néphrocalcinose et des lésions rénales progressives [61]. Le lumasiran cible le gène de l'hydroxyacide oxydase 1, qui code pour la glycolate oxydase (GO). La GO catalyse la conversion du glycolate en glyoxylate précurseur de l'oxalate. La réduction de l'expression de GO entraîne donc la réduction de la production d'oxalate [62].

Le **Leqvio (inclisiran)** (*Figure 9*) est approuvé en 2020 par l'EMA et en 2021 par la FDA pour l'utilisation chez des adultes atteints d'hypercholestérolémie primaire ou de dyslipidémie mixte. Il est utilisé la plupart du temps en complément d'autres traitements hypolipémiants (souvent les statines) chez des patients incapables d'atteindre les objectifs de cholestérol. L'inclisiran cible la proprotéine convertase subtilisine / kexine de type 9 (PCSK9), exprimée en majorité dans le foie [63]. PCSK9 module la durée de vie des récepteurs LDL. Il circule et se lie aux récepteurs LDL favorisant leur

internalisation et leur dégradation dans les lysosomes. C'est pourquoi, l'inclisiran inhibe la synthèse de la PCSK9 régulant ainsi positivement le nombre de récepteur LDL sur les hépatocytes, abaissant ainsi la concentration plasmatique de LDL [64].

Le dernier siARN approuvé est l'**Amvuttra (vutrisiran)** (Figure 9) en 2022 par la FDA et l'EMA dans le traitement de l'ATTR. Il est administré par voie sous-cutanée [65] et permet comme le patisiran d'inactiver le gène codant pour le TTR [66].



*Figure 9 : siARN ayant été commercialisés : Onpatro [67], Givlaari [68], Oxlumo [69], Amvuttra [70] et Leqvio [71].*



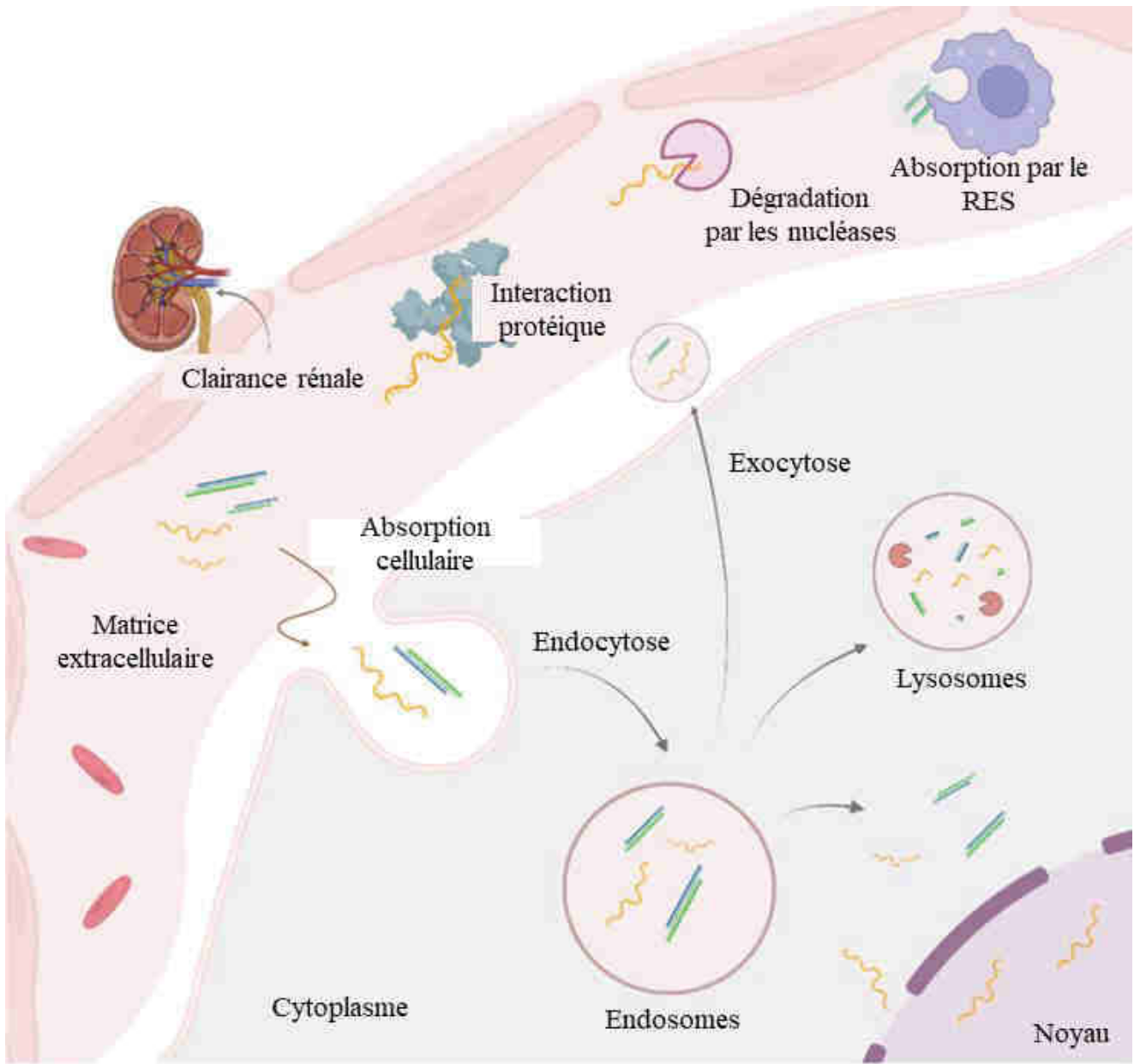
Cependant, l'utilisation et la commercialisation des ON n'a pas été si simple. Pendant de nombreuses années, la thérapie par ON n'était pas envisageable. Des inconvénients clairs ont limité leurs succès en clinique. Ils possédaient, en effet, de nombreux défauts avec une courte demi-vie causée par la clairance du système réticulo-endothélial (RES) et la dégradation par les nucléases [56], une faible affinité de liaison à l'ARN cible, l'induction des réponses immunitaires, une absorption cellulaire et distribution défavorables, ... [6]. Les **modifications chimiques** ont alors été envisagées, dans le but d'améliorer leur efficacité clinique, permettant alors la mise sur le marché de nombreux ON.

### 3. Modifications chimiques des oligonucléotides

De **nombreuses barrières** empêchent les ON d'exercer leur rôle thérapeutique (*Figure 10*). En effet, l'ADN et l'ARN non modifiés présentent une activité minimale étant sensibles à la dégradation par les nucléases, rapidement excrétés par les reins dans les urines, sensibles à l'absorption par les phagocytes et pouvant interagir avec des protéines, les empêchant ainsi d'atteindre leur cible [5, 12] (*Figure 10*).

Pour pénétrer au sein des cellules, les ON sont **endocytés**. Cependant, un de leurs plus grands obstacles est leur incapacité à s'internaliser efficacement et à échapper aux endosomes pour atteindre leur cible [12]. En effet, une fois dans les endosomes, ils pourront être transférés vers les lysosomes où ils sont dégradés ou bien se retrouver dans le milieu extracellulaire via exocytose (*Figure 10*). Finalement, seul 1 à 2% des ON administrés s'échappent des endosomes pour atteindre leur cible [5].

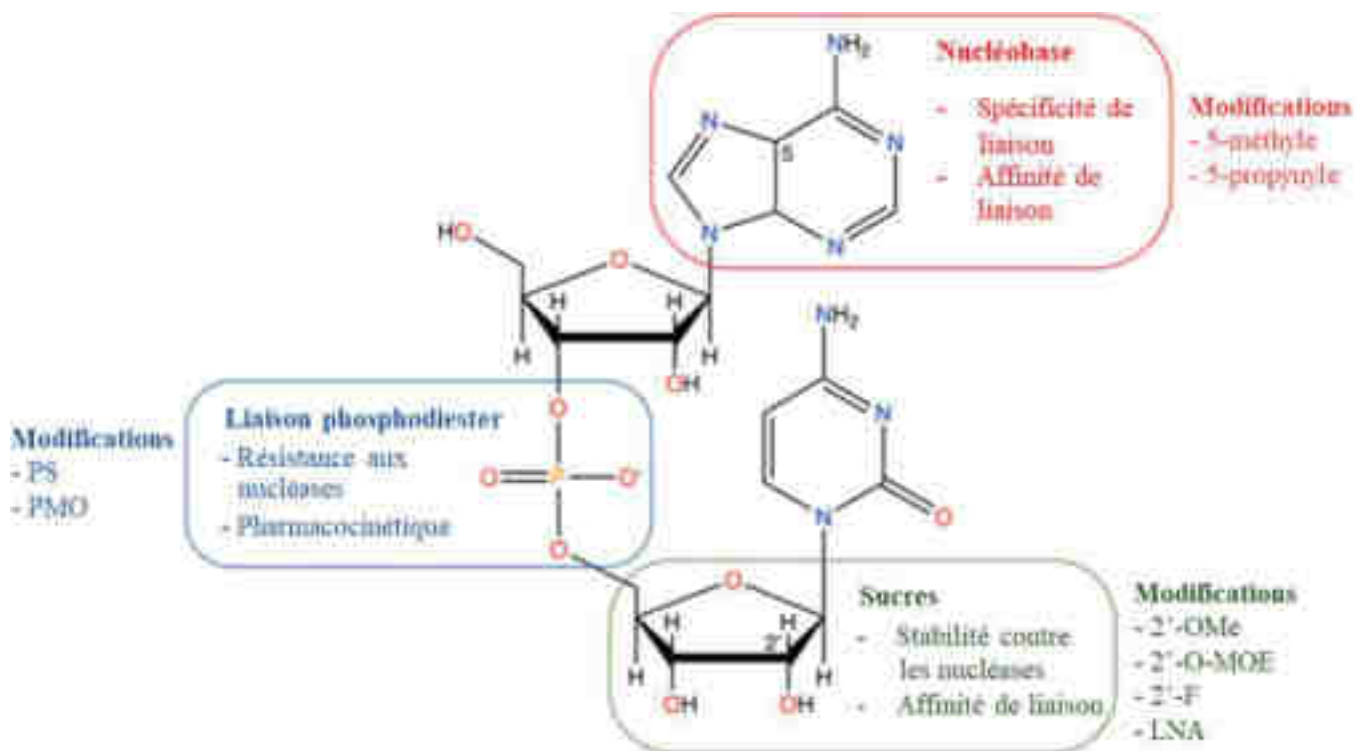
En plus d'un profil pharmacocinétique, d'une absorption cellulaire et d'une efficacité médiocre [72], les ON peuvent également être toxiques et induire des effets hors cibles et des réponses immunitaires [12]. Heureusement, les propriétés pharmacocinétiques des ON dépendent fortement des **modifications chimiques** [48].



*Figure 10 : Barrières biologiques empêchant l'activité thérapeutique des ON. Les ON peuvent être dégradés par les nucléases, excrétés par les reins, absorbés par les phagocytes et interagir avec des protéines avant d'atteindre leur cible. L'endocytose cellulaire permet l'absorption cellulaire des ON. Cependant, la plupart sont transférés vers les lysosomes où ils sont dégradés, ou bien sont recyclés dans la matrice extracellulaire via exocytose. 1 à 2% atteignent leur cible dans le cytosol ou le noyau [5].*

L'utilisation des modifications chimiques permet d'améliorer la stabilité métabolique, la biodisponibilité, l'affinité de liaison à la cible, ainsi que diminuer l'immunogénicité thérapeutique [5, 55]. Cependant toutes les modifications ne sont pas compatibles avec toutes les classes d'ON, qui dans certains cas peuvent diminuer leur activité et modifier leur mode d'action [5]. Des centaines de modifications ont été conçues, synthétisées et testées à la recherche de la modification parfaite [73]. Les

ON sont modifiés sur leurs trois régions : la **nucléobase**, la **liaison phosphodiester** et le **sucres ribose** [12, 55] (Figure 11).



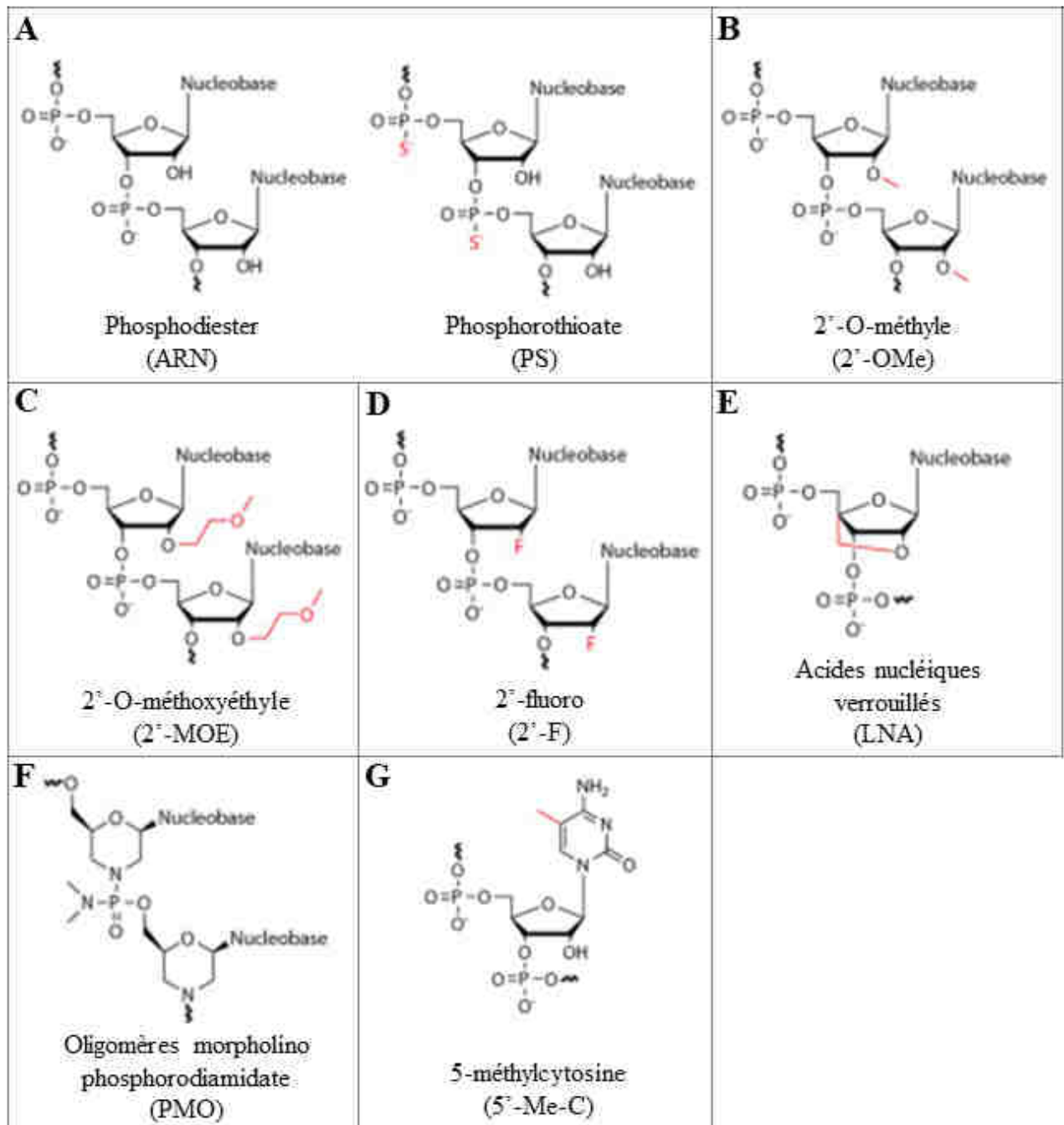
*Figure 11 : Modifications chimiques courantes pour les ON ARN. Ils peuvent être modifiés au niveau de la nucléobase, du sucre et également de la liaison phosphodiester [12].*

La **liaison phosphodiester** (Figure 11) est l'un des points faibles majeur des ON, étant sensible à la dégradation par les nucléases, elle confère à l'ON une courte demi-vie de circulation. Afin de l'améliorer, une modification y est apportée. La plus courante est la **modification phosphorothioate** (PS) (Figure 12 A), où un oxygène est remplacé par un atome de soufre [12, 48]. L'ON acquiert alors une résistance aux nucléases [20], son absorption cellulaire et sa biodisponibilité sont améliorées et il est largement distribué, se liant ainsi aux protéines intracellulaires [6, 18]. Ce sont des modifications faciles à incorporer, compatibles avec le recrutement de la RNase H [16 73]. Cependant, elles peuvent entraîner une diminution de l'affinité de liaison à sa cible, une toxicité majeure dues aux interactions protéiques et ne pas totalement le protéger contre les nucléases, c'est pourquoi elle est souvent associée à des modifications de bases et de sucres [5, 12, 15]. Cette modification, appelée **modification de première génération**, est la première appliquée aux ASO et reste la plus utilisée [15, 17].

Afin d'augmenter au maximum la stabilité de l'ON contre la dégradation par les nucléases, des **modifications des sucres** (*Figure 11*) sont utilisées [12]. En effet, le deuxième point faible des ON est le groupe 2'-hydroxyle (2'-OH) sur le cycle ribose [48]. Le groupe 2'-OH du sucre peut alors être remplacé par un groupe **2'-O-méthyle** (2'-OMe), **2'-fluoro** (2'-F) ou encore **2'-O-méthoxyéthyle** (2'-O-MOE) (*Figure 12 B. C. et D.*) [55]. Cette modification permet de réduire l'immunogénicité et les effets hors cible en supprimant les séquences partiellement complémentaires, d'augmenter la stabilité contre les nucléases [20, 55] et d'améliorer l'affinité de liaison à la cible. La modification MOE, **modification de 2<sup>ème</sup> génération** [17], est apparue comme l'une des chimies les plus réussies et offre une augmentation supplémentaire de la résistance aux nucléases et de l'affinité de liaison [15, 74]. Cependant, les MOE peuvent être trop volumineux et réduire l'activité de certains ON [16]. Les ON peuvent également contenir des modifications qui verrouillent le nucléotide. C'est le cas des **acides nucléiques verrouillés** (LNA) (*Figure 12 E*) où un pont méthylène relie l'oxygène 2' au carbone 4' dans le ribose [16, 72], permettant ainsi la réduction de la flexibilité conformationnelle des nucléotides [15]. Ils sont utilisés afin d'augmenter l'affinité de liaison à la cible et la stabilité du duplex [12, 18].

Les **oligomères morpholino phosphorodiamidate** (PMO) (*Figure 12 F*) souvent appelés morpholinos ont également été beaucoup utilisés. La liaison phosphodiester et le sucre ribose y sont remplacés par des liaisons morpholines synthétiques non chargées [12]. Cette **modification de troisième génération** [17] leur confère un squelette neutre complètement résistant aux nucléases [74], ainsi qu'une spécificité et efficacité élevées [5, 16]. Elle peut cependant limiter la liaison aux protéines sériques et donc entraîner une clairance sanguine plus rapide, ce qui limite la distribution tissulaire [5, 12]

Enfin, des **modifications sur les nucléobases** (*Figure 11*) peuvent être réalisées lorsqu'un appariement de base Watson-Crick plus fort est nécessaire. La plus courante est la modification **5-méthyle** (*Figure 12 G*) dans laquelle un groupe méthyle est attaché sur la position 5 des pyrimidines (C, U et T), site de substitution le plus utilisé [12, 16]. La stabilité thermique du duplex formé entre l'ON et l'ARN cible est alors augmentée [12] et le profil immuno-stimulateur réduit. Cependant, une modification trop importante de la nucléobase peut affecter négativement l'activité des ON [5].



*Figure 12 : Structures des modifications chimiques apportées aux ON. A. Phosphodiester et PS. B. Ribose modifié en 2'-OMe. C. Ribose modifié en 2'-O-MOE. D. Ribose modifié en 2'-F. E. LNA. F. PMO. G. 5-méthylcytosine (5'-Me-C) [18].*

Les modifications sont donc un compromis entre **stabilité**, **affinité** et **compatibilité** avec le mécanisme d'action [73]. Elles ne devront pas être trop volumineuses, au risque d'empêcher la liaison au RISC et l'utilisation de la RNase H. Cela limite donc l'étendue des modifications [12]. Les différentes modifications apportées aux ON sont représentées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 2*).

Oligonucléotides	Modifications		
	Liaison Phosphodiester	Sucre	Bases
Fomivirsén	PS		
Mipomersén	PS	2'-O-MOE	5'-Me-C
Inotersén	PS	2'-O-MOE	5'-Me-C
Volanesorsén	PS	2'-O-MOE	5'-Me-C
Tofersén	PS	2'-O-MOE	5'-Me-C
Nusinersén	PS	2'-O-MOE	5'-Me-C
Eteplirsén	PMO		
Golodirsén	PMO		
Viltolarsén	PMO		
Casimersén	PMO		
Pegaptanib		2'-OMe, 2'-F	
Patisiran		2'-OMe	
Givosiran	PS	2'-OMe, 2'-F	
Lumasiran	PS	2'-OMe, 2'-F	
Inclisiran	PS	2'-OMe, 2'-F	
Vutrisiran	PS	2'-OMe, 2'-F	

*Tableau 2 : Différentes modifications apportées aux ON commercialisés. Modifications de la liaison phosphodiester, du sucre et de la base au sein des gapmers (bleu), des SSO (rouge), de l'aptamère (jaune) et des siARN (vert) [5, 12].*

Les ASO chimiquement modifiés sont alors capables de pénétrer spontanément les cellules et d'induire l'action souhaitée. Cependant, les siARN sont trop gros et trop chargés pour pénétrer les cellules sans aide. De plus, ils ne supportent pas toutes les modifications, les substituants volumineux en 2' du ribose (MOE) empêchant l'assemblage du RISC et un nombre trop élevé de PS entraînant une diminution de l'activité de l'ARNi. Ces modifications ne suffisent pas à augmenter convenablement l'absorption cellulaire des siARN et des **stratégies de conjugaison et de formulation** sont donc nécessaires [5].

## II. Lipides cationiques dans la vectorisation

Les ON sont polyanioniques et possèdent généralement un poids moléculaire élevé, entraînant une faible perméabilité à la membrane cellulaire. Pour éviter ces problèmes, **leur encapsulation** à l'aide de vecteurs peut être envisagée [75]. Les vecteurs permettent leur protection contre les enzymes, leur bon acheminement vers la cible, le contrôle de leur libération, la modification de la biodistribution et l'amélioration de la biodisponibilité [76]. Ils jouent donc un rôle majeur dans l'efficacité et la sécurité du produit [77]. La recherche a mis au point deux types de vecteurs pour pallier les faiblesses des ON : les vecteurs **viraux** et **non viraux** [78].

Les **vecteurs viraux**, tels que les rétrovirus et les adénovirus, ont été les premiers à être étudiés. Ce sont des virus modifiés dans lesquels la partie pathogène du génome est supprimée, tandis que la partie non pathogène, permettant d'infecter les cellules, est conservée [79]. Ils ont plusieurs avantages possédant une expression génique durable, protégeant le gène de la dégradation et offrant une bonne efficacité de transfection [78]. Cependant, de nombreux problèmes de toxicité et de sécurité sont rencontrés avec notamment l'activation de réponses immunitaires et un potentiel de mutagenèse par insertion [78, 80]. En plus de leur forte toxicité, leur coût de production est élevé [78, 81], leur capacité de chargement limitée [79, 81] et leur potentiel de ciblage faible [78]. Tous ces inconvénients les ont rendus moins attrayants, ouvrant la porte à un deuxième type de vecteur : les **vecteurs non viraux** [78, 81].

Les **vecteurs non viraux** représentent une alternative intéressante, étant plus sûrs, moins immunogènes, plus faciles à fabriquer et capables de transporter de plus grandes charges de matériel génétique [80, 82]. Cependant, leur capacité de transfection est faible. Ils ne possèdent pas la capacité naturelle des virus à surmonter efficacement les barrières cellulaires, ce qui rend le passage des membranes difficile, les ON n'atteignant alors pas leur cible [78]. Ils doivent donc être optimisés afin de favoriser l'endocytose et la fuite endosomale [79]. A cette fin, les chercheurs ont voulu obtenir des vecteurs appropriés basés sur des systèmes non viraux capables de fournir une expression génique durable sans déclencher des réactions inflammatoires et immunitaires indésirables [78]. La taille, la charge de surface, la forme, la constante d'ionisation et l'agrégation sont des caractéristiques déterminant leur efficacité et sécurité [83]. Les vecteurs sont donc synthétisés en utilisant différentes compositions, fonctionnalités et propriétés, dans le but de créer le vecteur idéal [79].

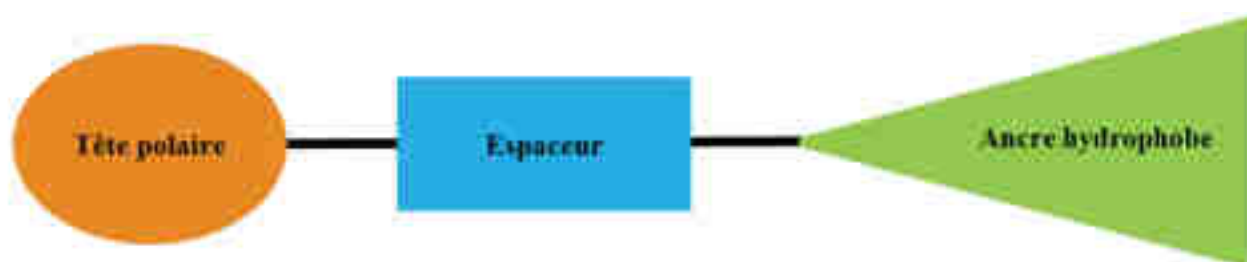
Les **vecteurs lipidiques** représentent l'alternative la plus largement utilisée face aux vecteurs viraux. Ils sont faciles à synthétiser et très facilement modifiables, ce qui permet de leur conférer les propriétés souhaitées [84]. Ils ont également suscité un intérêt scientifique en raison de leur **similitude structurelle avec les membranes cellulaires** [85]. Pour obtenir une bonne vectorisation des ON, des **lipides cationiques** sont utilisés. Ils permettent de former des complexes stables avec un bon piégeage et une

bonne complexation des ON [72]. Bien qu'ayant un rôle prédominant, les lipides cationiques ne sont pas les seuls composants des vecteurs lipidiques, des **lipides auxiliaires** tels que des lipides modifiés avec le polyéthylène glycol (PEG) et le cholestérol sont également trouvés dans leur composition.

## 1. Structure d'un lipide

Au sein de notre organisme, les **lipides** (terme venant du grec « *lipos* » signifiant graisse) occupent des fonctions biologiques importantes [86]. Ils possèdent en effet un rôle dans le stockage d'énergie, sont des messagers cellulaires et sont les principaux composants des membranes plasmiques [86, 87]. Les vecteurs lipidiques se rapprochent donc de la composition des membranes cellulaires, les rendant parfaitement biocompatibles et donc très attrayants [88]. De plus, comparés à d'autres matériaux de vectorisation, les lipides sont pour la plupart biodégradables, peu toxiques et capables de transporter des substances hydrophiles et hydrophobes [77].

Les lipides sont des composants pouvant être totalement hydrophobes, tels que les acides gras, ou bien amphiphiles (molécules présentant une double affinité, à la fois hydrophile et hydrophobe), tels que les phospholipides [87]. Les lipides utilisés dans la vectorisation possèdent tous une structure commune malgré leur nature chimique différente : un **groupe de tête hydrophile** (cationique ou non), un **espaceur** (ou **linker**) et un **domaine hydrophobe** (*Figure 13*) [88, 89, 90]. Ces trois parties influencent l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des vecteurs lipidiques [89].



*Figure 13* : Schéma simplifié de la structure d'un lipide [90].

La **partie hydrophile** d'un lipide cationique est constituée d'une **tête ou d'un groupe de têtes chargées positivement** [82, 91]. Les groupes de tête hydrophiles sont principalement des amines primaires, secondaires, tertiaires ou des sels d'ammonium quaternaire, mais d'autres groupes tels que le guanidinium, le phosphate, l'imidazole, l'acide aminé et le pyridinium peuvent être utilisés (*Tableau 3*)


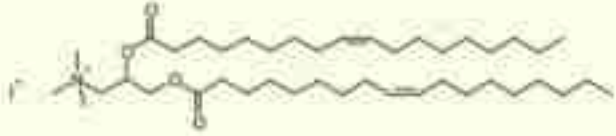
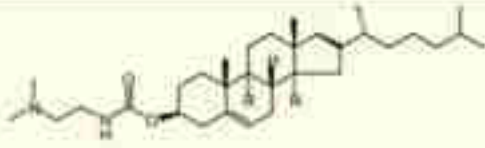


[77, 90, 92]. La principale fonction de ce groupe de tête est de condenser les ON via des interactions électrostatiques [89].

Nature de la tête	Exemple	Structure
Ammonium quaternaire	DOTMA	
Acides aminés	Alanine	
Pyridinium	SAINTs	
Polyamines	DOGS	


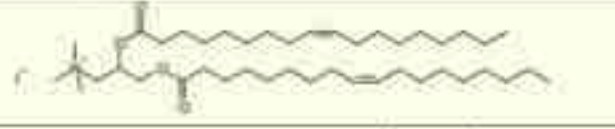
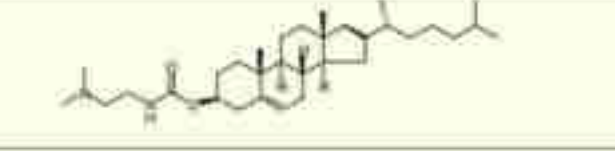
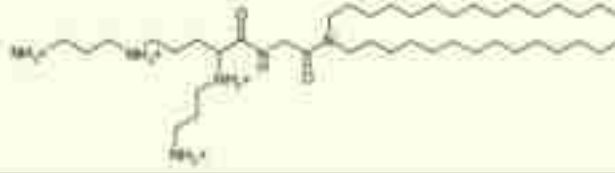
*Tableau 3 : Différents lipides cationiques selon la nature de leur tête. Di-oléoyloxy-propyl-triméthylammonium (DOTMA), synthétique amphiphile interaction (SAINTs), di-octadécylamido-glycyl-spermine (DOGS) [90].*

Les **domaines hydrophobes** sont composés soit de simples chaînes d'hydrocarbures aliphatiques telles que les chaînes d'acide gras de différentes longueurs et états d'insaturation, soit de stéroïdes tels que le cholestérol (Tableau 4) [77, 89, 92]. Ils contiennent tous des atomes d'hydrogène et de carbone à l'origine de leur hydrophobicité [90]. Le degré d'insaturation, la longueur, le type et la configuration de la chaîne hydrophobe influencent l'efficacité de transfection et d'autres facteurs tels que la cytotoxicité [89].

Nature de la queue	Exemple	Structure
Lipidique saturée	DMRIE	
Lipidique insaturée	DOTAP	
Cholestérol	DC-Chol	

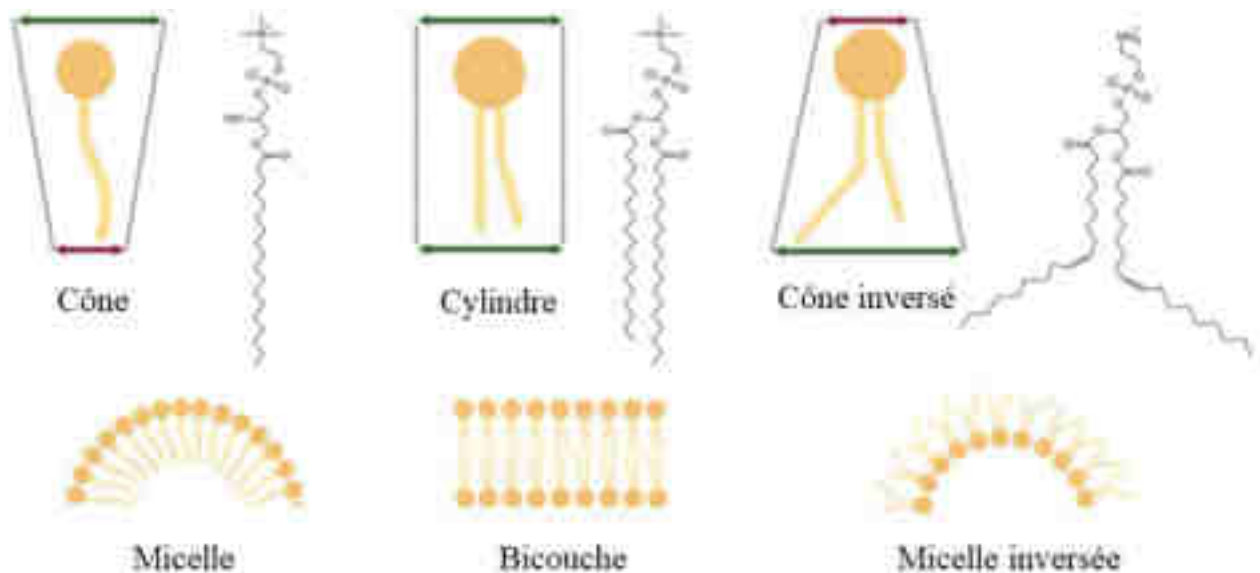
*Tableau 4: Différents lipides cationiques selon la nature de leur queue hydrophobe. Dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthyl ammonium (DMRIE), 1,2-bis(oléoyloxy)-3-(triméthylammonio) propane (DOTAP), 3-β-[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol (DC-Chol) [90].*

Enfin, le **groupe de liaison** permet de lier la tête cationique au corps hydrophobe. Les plus utilisés sont l'éther, l'ester, l'amide et le carbamate (*Tableau 5*) [92]. Il influence la stabilité, la biodégradabilité et l'efficacité de transfection du lipide. Finalement, la performance d'un lipide dépend de la **molécule entière** plutôt que de ses trois parties indépendantes [89].

Nature du linker	Exemple	Structure
Liaison éther	DOTMA	
Liaison ester	DOTAP	
Liaison carbonate	DC-Chol	
Liaison amide	DOGS	

*Tableau 5 : Différents lipides cationiques selon la nature de leur linker [90].*

Lorsque ces lipides sont placés dans un milieu aqueux, ils **s'auto-assemblent** protégeant les queues hydrophobes de l'eau. Les lipides forment alors des **bicouches**, des **micelles** ou bien des **micelles inversées** (*Figure 14*) [87, 91]. La forme des lipides joue un rôle majeur dans la détermination des structures d'auto-assemblage. Les lipides en forme de cône inversé donnent des structures micellaires inverses, les lipides cylindriques des membranes presque plates et les lipides en forme de cône des structures micellaires (*Figure 14*) [82]. La forme de ces structures d'auto-assemblage impacte également l'efficacité et la sécurité des vecteurs [83].



*Figure 14 : Hypothèse de la structure moléculaire. La structure des lipides détermine les structures d'auto-assemblage. Les lipides coniques (tête plus large que la queue) tels que le 1-Stearoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine forment des micelles. Les lipides cylindriques (tête aussi large que la queue) tels que le 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DSPC) forment des bicouches. Les lipides à cône inversé (tête plus petite que la queue) tels que le 1,2-Dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) forment des micelles inversées [79].*

Les lipides cationiques permettent la formation des vecteurs lipidiques, mais pour obtenir le vecteur idéal, peu toxique avec une bonne stabilité et efficacité de transfection, d'autres lipides entrent dans leur composition.

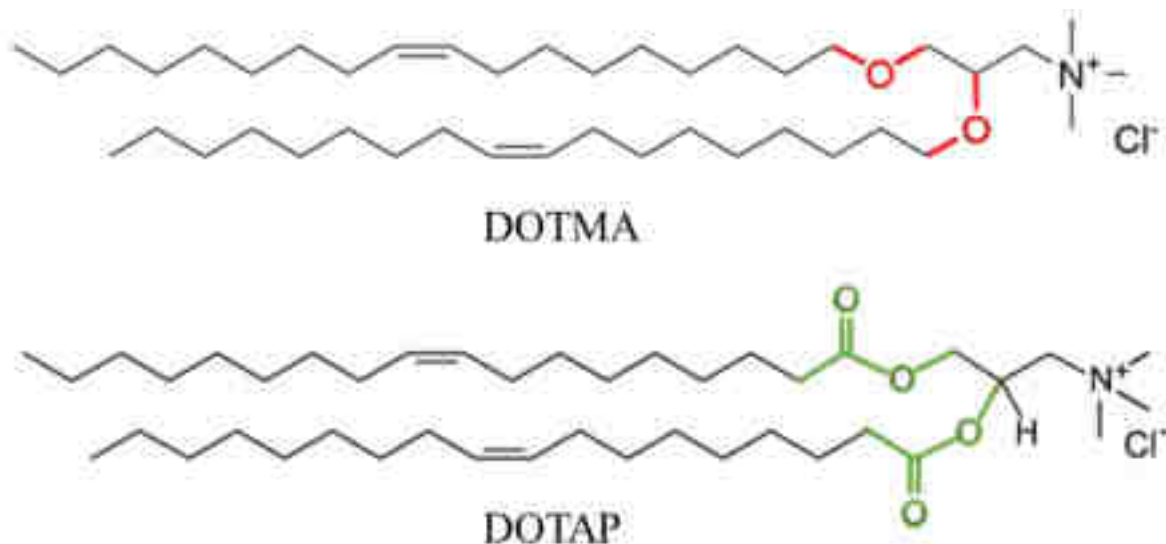
## 2. Composition des vecteurs lipidiques

Pour améliorer l'efficacité de transfection, les efforts se concentrent sur le développement de supports multi-composants comprenant des lipides cationiques comme constituants clés. Quatre composants principaux sont généralement utilisés : les **lipides cationiques** ou **ionisables**, le **PEG**, le **cholestérol** et les **phospholipides** [91]. La composition lipidique peut influencer la morphologie, la taille, l'efficacité d'encapsulation et les propriétés de surfaces des vecteurs [93] et jouent un rôle au niveau de la stabilité, du temps de demi-vie dans la circulation sanguine, de la tolérabilité, de l'absorption cellulaire, ... [91].

## a. Lipides cationiques

Au cours des dernières décennies, de nombreux **lipides cationiques** ont été développés afin d'administrer des médicaments, en particulier des AN. Ils ont été ajoutés à la composition des vecteurs lipidiques permettant une meilleure encapsulation des ON avec une efficacité de transfection améliorée. Cette charge cationique leur permet également de se lier plus facilement aux membranes cellulaires chargées négativement, améliorant ainsi la fuite endosomale et la délivrance à la cible [92, 94, 95].

En 1987, **Felgner** et son équipe utilisent pour la première fois un lipide cationique, le **DOTMA**, pour le transfert d'AN [90, 92, 96]. Le **DOTAP** et le **DOTMA** sont les deux lipides cationiques les plus utilisés dans la transfection. Ils diffèrent seulement par leur groupe espaceur, le DOTAP contenant des liaisons **esters** hydrolysables et le DOTMA des liaisons **éthers** stables (*Figure 15*) [94]. Ils sont disponibles dans le commerce et fréquemment utilisés comme étalon dans diverses expériences étudiant l'efficacité de transfection [92].



*Figure 15 : Structure du DOTMA et DOTAP deux lipides cationiques. Le DOTMA possède des liaisons éthers (en rouge), tandis que le DOTAP possède des liaisons esters (en vert) [92].*

Cependant, une quantité importante de lipides cationiques est nécessaire pour obtenir une efficacité d'encapsulation élevée, entraînant une augmentation de la charge cationique superficielle [72]. Cette charge cationique provoque des **toxicités** cellulaires ainsi que l'activation du **système immunitaire** [72, 92, 97]. Les lipides cationiques se lient de manière non spécifique aux protéines sériques, forment des agrégats et sont éliminés par le RES [72, 92], leur conférant une courte demi-vie de circulation [77, 80].

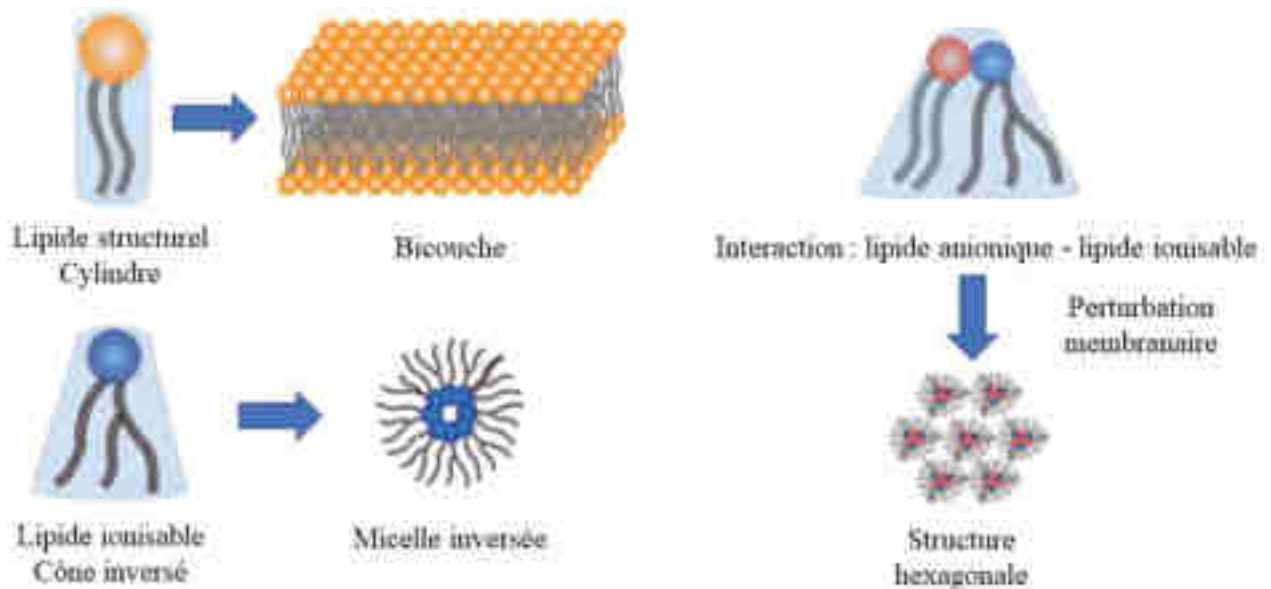
Les lipides cationiques chargés en permanence ne sont donc pas un choix judicieux dans la formation des vecteurs lipidiques [97]. La charge cationique est cependant nécessaire, c'est pourquoi des **lipides ionisables** sont développés.

## **b. Lipides ionisables**

Les **lipides ionisables** sont la classe de lipides la plus prometteuse pour l'administration d'ON [94]. Ils ont été introduits pour la première fois par **Semple** et son équipe dans le domaine des AN [80, 98]. Ils composent environ 50% des lipides des vecteurs [99] et possèdent les avantages de la charge cationique sans ses inconvénients [98].

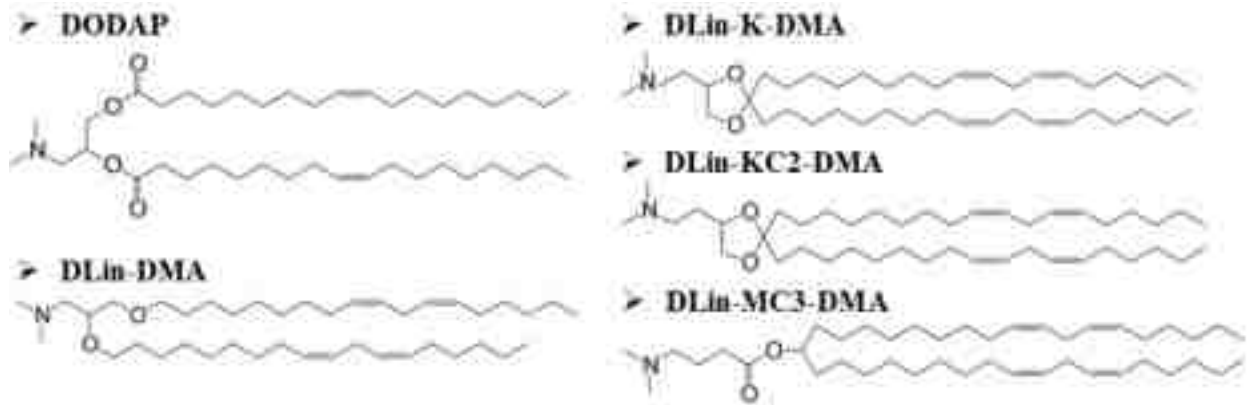
Ils sont capables de modifier leur charge **en fonction du pH de l'environnement** [80]. Ce sont des **lipides neutres à un pH physiologique**, ce qui permet de réduire la toxicité et d'augmenter leur demi-vie de circulation dans le sang [91, 94]. Cette charge neutre empêche l'adsorption non spécifique de protéines sériques [93, 100], l'élimination rapide du sang par le RES et l'activation du système immunitaire [98].

Les lipides ionisables sont **cationiques à un pH acide**, facilitant la complexation et l'évasion endosomale [77, 91]. Les vecteurs lipidiques sont préparés à pH acide, permettant au lipide de complexer l'ON avec une efficacité d'encapsulation élevée [93, 101]. Les lipides ionisables se protonent également dans l'endosome qui est acidifié en permanence par les pompes à protons V-ATPase [94, 97]. Ils peuvent alors interagir avec les lipides anioniques de la bicouche endosomale. La membrane passe d'une structure bicouche à une structure hexagonale (micelle inversée) (*Figure 16*), conduisant à la rupture membranaire et favorisant ainsi l'échappement des ON dans le cytosol [91, 93, 97].



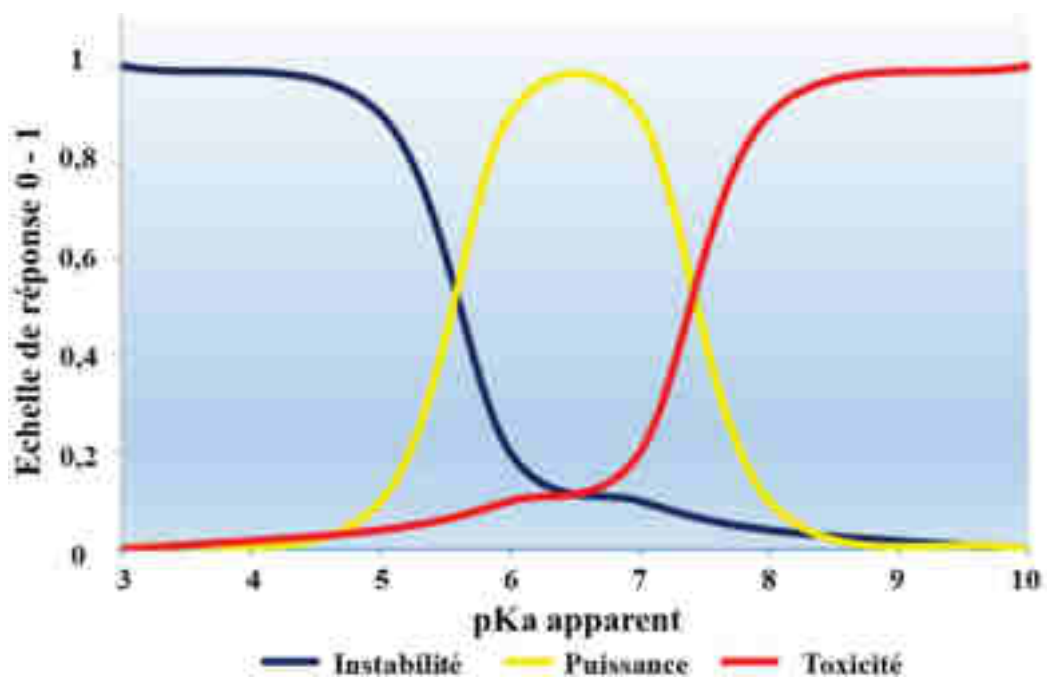
*Figure 16 : Formation de structures hexagonales. L'interaction entre un lipide anionique composant la membrane endosomale et un lipide ionisable chargé positivement favorise la formation de structures hexagonales perturbant ainsi la membrane [101].*

Le 1,2-dioléoyloxy-3-(diméthylamino)propane (**DODAP**) est le tout premier lipide ionisable rapporté (*Figure 17*) [101]. Par la suite d'autres lipides ionisables ont été créés tels que le 1,2-dilinoléoyloxy- *N,N*-diméthyl-3-aminopropane (**DLin-DMA**) et l'heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(diméthylamino)butanoate (**DLin-MC3-DMA**) (*Figure 17*) [100]. Le DLin-MC3-DMA est le lipide ionisable de référence en raison de son activité supérieure de silençage génique [77]. Il est développé en faisant varier la structure du DLin-DMA. Le 2,2-dilinoléyl-4-diméthylaminométhyl-[1,3]-dioxolane (**DLin-K-DMA**) (*Figure 17*) est développé en introduisant un cycle cétal dans le linker du DLin-DMA augmentant l'activité du silençage. Puis, le 2,2-dilinoléyl-4-(2-diméthylaminoéthyl)-[1,3]-dioxolane (**DLin-KC2-DMA**) (*Figure 17*) est développé en introduisant un groupe méthylène entre le cycle cétal et l'amine ionisable améliorant également l'activité. Enfin, 53 analogues de KC2 ont été réalisés, donnant naissance au DLin-MC3-DMA [83].



*Figure 17 : Structures chimiques des lipides ionisables. Représentation du DODAP, DLin-DMA, DLin-K-DMA et DLin-MC3-DMA [100].*

Les plus puissants lipides ionisables utilisés pour encapsuler des siARN possèdent une **constante de dissociation acide** (pKa) comprise entre **6,2 et 6,5** (Figure 18), où l'équilibre entre la charge neutre en circulation et la charge positive au pH endosomal est optimal [93, 97, 100]. Le pKa est donc l'une des propriétés physico-chimiques les plus importantes des groupes de tête, déterminant le comportement d'ionisation et la charge de surface [83]. A un pH inférieur au pKa, le lipide ionisable est protoné et acquiert une charge positive [95].



*Figure 18 : Effets des valeurs de pKa sur l'instabilité, la puissance et la toxicité des vecteurs lipidiques. La plage optimale se situe entre 6 et 7 de pKa. Les vecteurs avec un pKa plus élevé portent des charges*



positives au pH physiologique entraînant des toxicités. Les vecteurs avec un pKa plus faible n'ont pas assez de charges ioniques et de polarité, entraînant leur agrégation (les interactions hydrophobes étant plus fortes). Enfin, les vecteurs à pKa inférieur à 6 ou supérieur à 7 ne s'ionisent pas efficacement dans l'endosome, empêchant leur échappement et la libération de leur cargaison [83].

D'autres paramètres sont à prendre en compte tels que le **degré d'insaturation** du domaine hydrophobe. La puissance de délivrance est améliorée lorsque le degré d'insaturation du domaine hydrophobe est augmenté. En effet, l'ajout d'insaturations favorise la formation de groupes fusogènes et donc la fuite endosomale. Pour éviter la toxicité, il est également important de prendre en compte la **biodégradabilité**. Des groupes **esters** sont introduits dans les lipides. Ces groupes peuvent être clivés par des enzymes estérases facilitant la métabolisation des composés et donc l'élimination du sang et des tissus en quelques heures [80]. Des améliorations supplémentaires peuvent être ajoutées aux vecteurs lipidiques en surveillant leur composition et en intégrant des **lipides auxiliaires**.

### c. Lipides auxiliaires

En plus des lipides cationiques et ionisables, des **lipides auxiliaires**, également appelés lipides structuraux, sont utilisés pour stabiliser les vecteurs, favoriser l'absorption cellulaire et l'échappement endosomal et améliorer l'efficacité de transfection et le trafic intracellulaire [95]. Contrairement aux lipides cationiques et ionisables, ce sont des matériaux neutres. Les **phospholipides**, le **cholestérol** et les **lipides-PEG** sont des lipides auxiliaires couramment utilisés dans la formulation des vecteurs lipidiques [72, 80, 83].

#### ◆ Phospholipides

Le **DOPE** et le **DSPC** sont les deux phospholipides les plus utilisés dans la formation de vecteurs lipidiques. En fonction du phospholipide choisi, ils fournissent une stabilité structurelle aux bicouches lipidiques [95] ou facilitent la fusion membranaire et ainsi l'échappement endosomal [80].

Le **DOPE** est une phosphatidyléthanolamine possédant des chaînes acyles insaturées et un petit groupe de tête lui conférant une forme conique inversée (*Figure 19*), c'est l'un des premiers lipides auxiliaires utilisés pour l'administration d'ON [93]. Sa forme de cône inversée améliore la fusion membranaire et la rupture des bicouches lipidiques, c'est pourquoi il est souvent appelé lipide fusogène [77, 93]. Cependant, la stabilité colloïdale des vecteurs contenant du DOPE est diminuée [93].

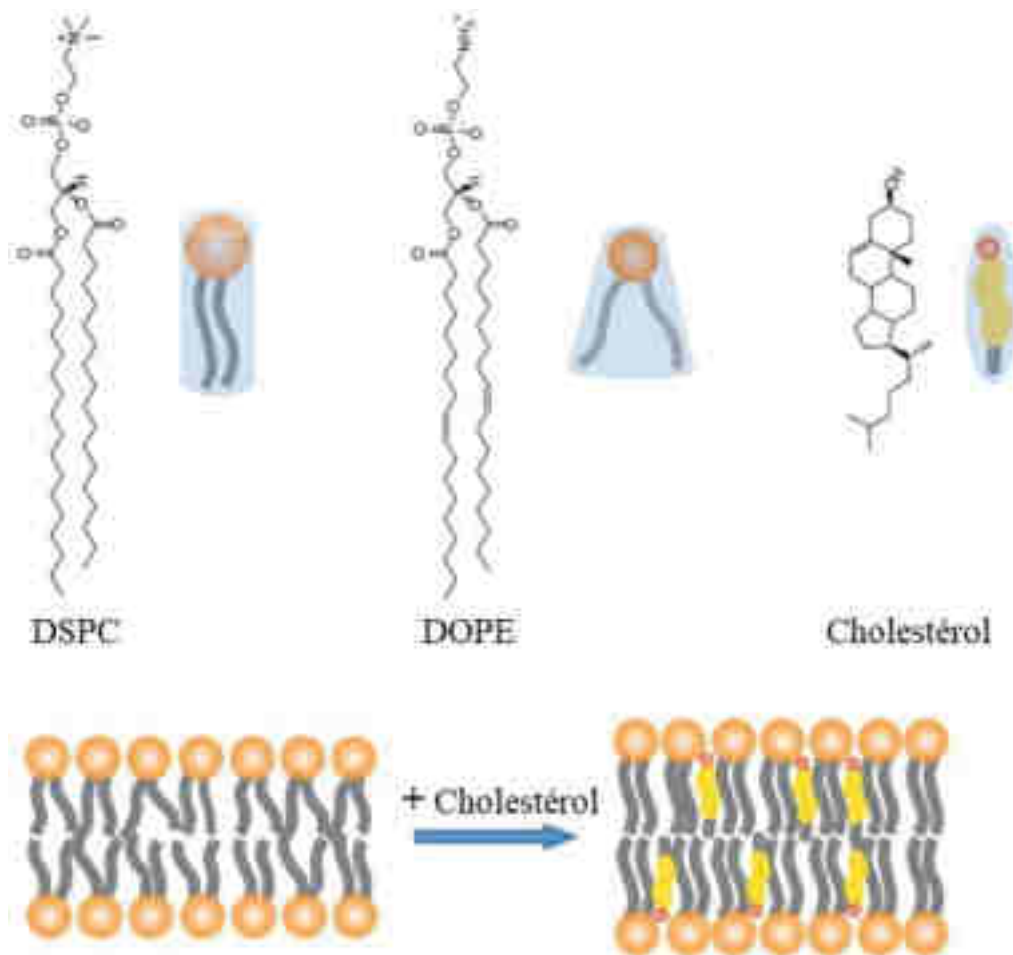
Le **DSPC** est une phosphatidylcholine possédant des chaînes acyles saturées et un grand groupe de tête, lui conférant une forme cylindrique (*Figure 19*). Il soutient la formation des bicouches lipidiques et apporte une grande stabilité aux particules, améliorant le temps de circulation dans le sang [93, 101]. Les systèmes commerciaux actuels incluent uniquement le DSPC comme phospholipide en raison de sa grande stabilité et du fait que les lipides ionisables sont capables de perturber efficacement la membrane endosomale.

Au cours du temps, la proportion de phospholipides a été de plus en plus diminuée. Cela est dû à l'augmentation de la proportion de lipides ionisables nécessaires à la liaison et l'encapsulation des ON [101]. Aujourd'hui, les phospholipides sont utilisés à une concentration d'environ 10% des lipides totaux [99].

#### ◆ Cholestérol

Le **cholestérol** (*Figure 19*) est un composé majeur des membranes eucaryotes, intervenant également dans la composition des vecteurs lipidiques [93]. Il est utilisé à une concentration d'environ 30 à 40 % des lipides totaux [99]. C'est un lipide neutre permettant d'améliorer l'emballage lipidique, la stabilité, l'intégrité structurelle, et de diminuer la perméabilité de la bicouche lipidique [80, 93]. Le cholestérol possède une structure rigide et permet de combler les espaces entre les phospholipides empêchant ainsi la mobilité de leur chaîne carbonée (*Figure 19*) [94]. L'augmentation de la rigidité de la bicouche lipidique empêche la fuite précoce des ON [95, 101].

L'efficacité de livraison est également optimisée, le cholestérol permettant l'amélioration de la fusion membranaire. Le cholestérol présente une faible solubilité au sein du noyau des particules entraînant son accumulation sous forme cristalline à la surface des vecteurs. La bicouche lipidique est alors déstabilisée et l'échappement endosomal amélioré [80, 94].



*Figure 19* : Formes et structures chimiques des phospholipides et du cholestérol. Le DSPC présente une forme cylindrique, tandis que le DOPE a une forme en cône inversé. L'ajout de cholestérol permet de combler les espaces entre les phospholipides augmentant la rigidité de la bicouche lipidique [101].

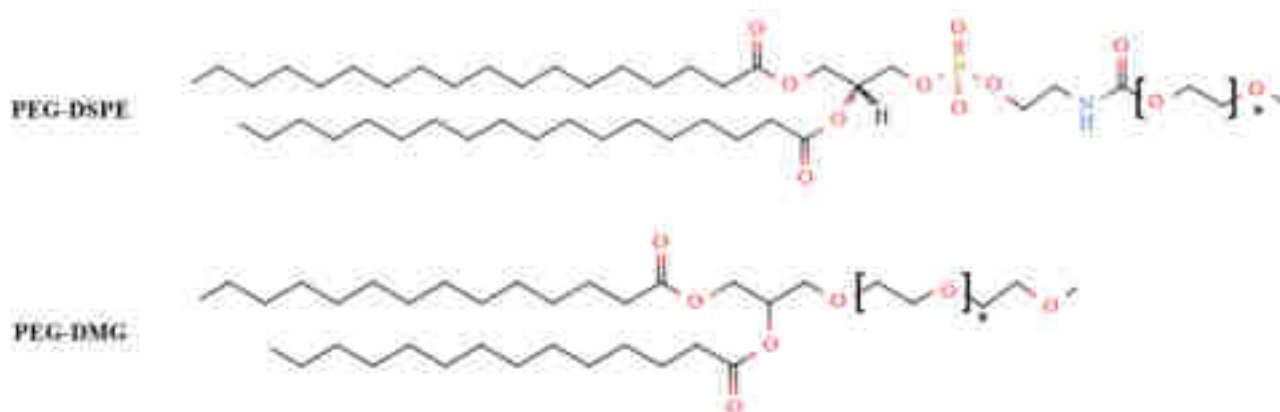
#### ◆ PEG

L'ajout de **PEG** (polyéthylène glycol) à la composition des vecteurs lipidiques a été une étape importante [93]. Les lipides-PEG sont des **polymères hydrophiles conjugués à des ancres lipidiques hydrophobes**. Ces chaînes hydrophobes leur permettent de s'ancrer dans la bicouche lipidique [80, 100]. Les PEG se localisent alors à la surface des particules [80, 99]. Ils représentent 1 à 5% des lipides totaux utilisés pour la composition des vecteurs [99].

Ces lipides-PEG forment une **barrière**, masquant la surface des particules [80]. Cela entraîne la protection des vecteurs des opsonines et permet ainsi d'éviter leur élimination précoce par le RES. Leur temps de circulation dans le sang est alors augmenté [93, 95]. En plus du rôle de barrière, les lipides-

PEG permettent de contrôler la taille des particules [77]. L'incorporation de PEG entraîne l'obtention de structures nanométriques (environ 50 à 100 nm) [80]. Ils améliorent également la dispersibilité en solution aqueuse [100], empêchent leur agrégation lors de la préparation, du stockage et dans la circulation [93, 101], l'agrégation pouvant conduire à une libération prématurée de l'ON [95]. La stabilité globale de la NP est alors augmentée [80, 93].

Cependant, l'ajout des lipides-PEG diminue l'absorption cellulaire et la fusogénicité des vecteurs empêchant alors la libération endosomale, c'est le **dilemme de PEG** [93, 95]. Les interactions entre les NP et les cellules cibles sont limitées [100, 101]. De plus, une trop grande concentration de lipides PEG provoque un encombrement stérique pouvant aboutir à l'augmentation du diamètre et à la déstabilisation de la membrane des particules. C'est pourquoi la quantité de lipides pegylés doit être soigneusement contrôlée et réduite au minimum (environ 1.5%) [80]. L'efficacité de transfection est également affectée par la longueur de l'ancre lipidique. Les chaînes les plus courtes possèdent une meilleure capacité de dissociation et donc une meilleure efficacité de transfection [94]. Le distéaroyl-phosphatidyléthanolamine (DSPE)-PEG2000 (*Figure 20*) est un lipide conventionnel restant fermement lié aux particules et empêchant ainsi la libération des ON. Des lipides PEG possédant des chaînes acyles plus courtes, tels que le PEG-DMG, ont ensuite été utilisés (*Figure 20*). Ils sont capables de diffuser progressivement hors de la particule, les déstabilisant et libérant ainsi l'ON [80].



*Figure 20* : Structure chimique de lipides-PEG. Représentation du lipide PEG-DSPE et PEG-DMG [101].

Afin de résoudre le dilemme de PEG, d'autres stratégies sont envisagées. C'est le cas des lipides-PEG **sensibles au pH**. Des liaisons acido-labiles, telle que la liaison acylhydrazone, sont incorporées entre les queues hydrophobes et les fragments PEG. Cet ajout induit une dépeglylation des NP à un pH faible (d'environ 5) au sein des endosomes tardifs. L'acidification du milieu permet de couper les chaînes PEG

et ainsi d'améliorer l'efficacité de transfection en rétablissant le contact des lipides ionisables avec la membrane des endosomes. Il est également possible d'utiliser des **ligands** tels que des anticorps, peptides et aptamères pour résoudre le problème. La NP est marquée par un ligand, ce qui lui permet de pénétrer en plus grand nombre dans ses cellules cibles par phénomène d'endocytose médiée par un récepteur [82].

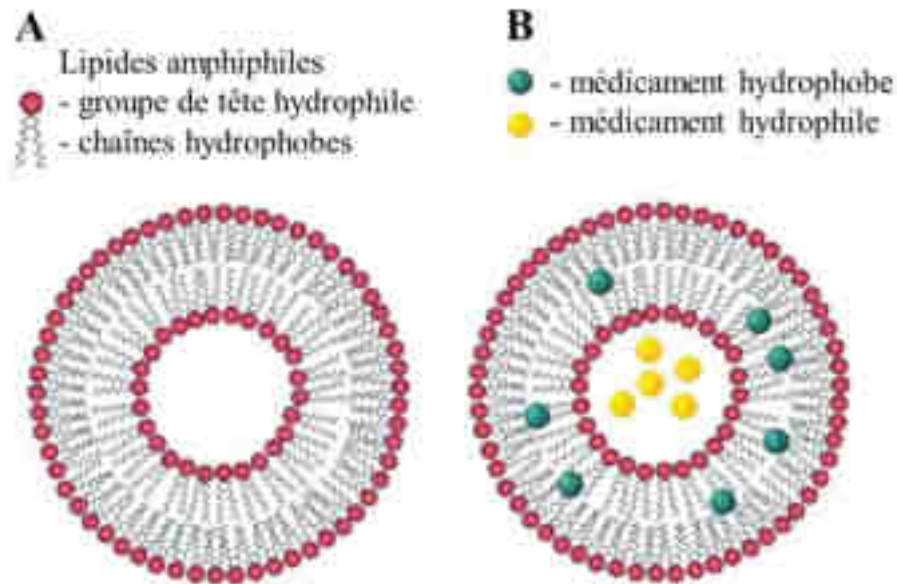
Le choix des lipides est donc important, influençant la stabilité, la taille, la distribution ainsi que l'efficacité de transfection. Ce choix dépend à la fois de l'organe cible, de la voie d'administration utilisée et du type de cellule visée [101]. Tous ces lipides sont utilisés pour réaliser différents types de vecteurs lipidiques.

### 3. Différents types de vecteurs à base de lipides

De nombreux types de vecteurs lipidiques ont vu le jour. Ils possèdent une biocompatibilité élevée, une simplicité de formation, un auto-assemblage, une bonne biodisponibilité et la capacité à transporter de grandes charges utiles [102]. Les **liposomes**, les **lipoplexes** et les **systèmes de NPL avancés** (cliniquement approuvés pour l'encapsulation de siARN et d'ARNm) seront abordés au sein de cette partie.

#### a. Liposomes

Les liposomes sont les premiers systèmes de délivrance à base de lipides à voir le jour [72]. Ce sont des **vésicules sphériques** de lipides amphiphiles comprenant des **bicouches lipidiques uni- ou multi-lamellaires** [102, 103, 104]. Ils sont de taille micro ou nanoscopique [78], variant de 20 à 1 000 nm environ et généralement composés de phospholipides et de cholestérol [102, 105]. Les phospholipides amphiphiles s'auto-assemblent formant les bicouches lipidiques et créant ainsi un environnement pour l'encapsulation de médicaments [106]. Ces vecteurs renferment un **noyau aqueux** où les molécules hydrophiles peuvent être encapsulées. Les molécules hydrophobes peuvent être placées au sein de la bicouche lipidique (*Figure 21*) [85, 105, 107]. De plus, les liposomes possèdent une faible toxicité et immunogénicité, une bonne biocompatibilité, une biodégradabilité, une flexibilité structurelle et une facilité de manipulation [108].



*Figure 21 : Représentation d'un liposome. A. Liposome réalisé à l'aide de lipides amphiphiles s'auto-assemblant. B. Liposome contenant des médicaments hydrophiles (jaune) au sein de son noyau aqueux et hydrophobes (bleu) au sein de sa bicouche lipidique [105].*

Les liposomes possèdent différentes tailles, compositions, charges et lamellarité [104]. Ces caractéristiques permettent de les classer en plusieurs catégories.

#### ◆ Classification des liposomes en fonction de leur structure et leur taille

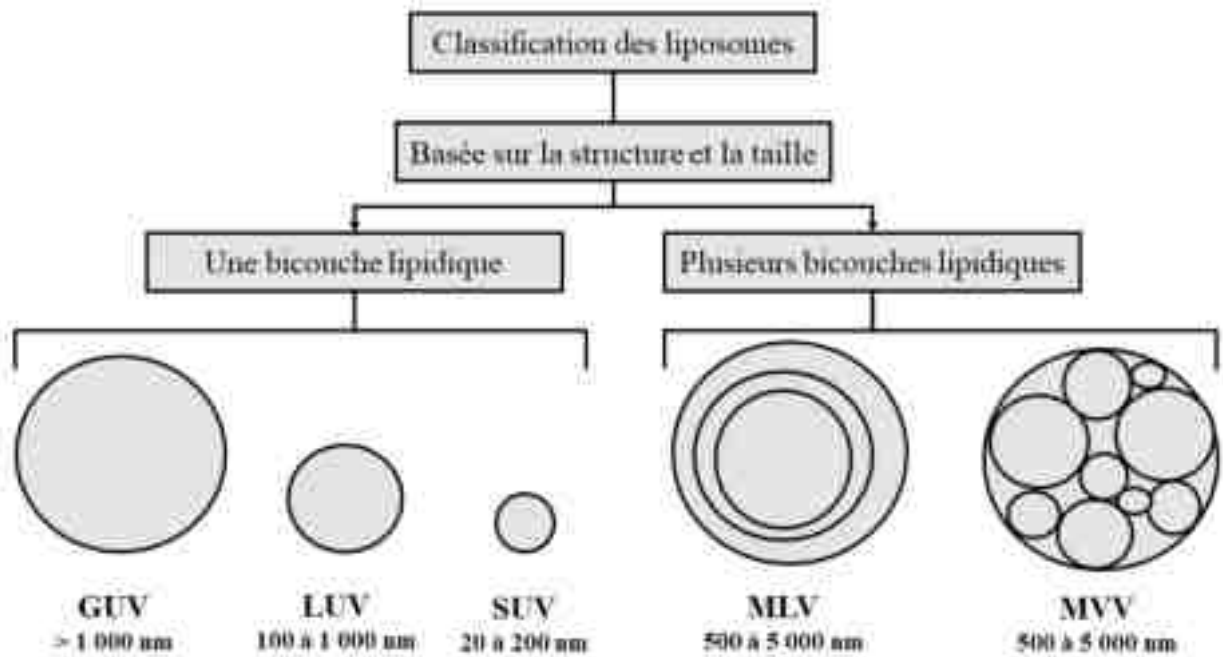
Les liposomes peuvent être classés en fonction de leur **structure** (liposomes **unilamellaires** et **multilamellaires**) et en fonction de leur **taille** (*Figure 22*).

Les liposomes contenant une seule bicouche lipidique entourent un compartiment aqueux et peuvent être classés en fonction de leur dimension :

- Les **petites vésicules unilamellaires** (SUV) : diamètre de 20 à 100 nm.
- Les **grandes vésicules unilamellaires** (LUV) : diamètre de 100 à 1 000 nm.
- Les **vésicules unilamellaires géantes** (GUV) : diamètre supérieur à 1 000 nm.

Les liposomes composés de plusieurs bicouches lipidiques possèdent des diamètres supérieurs à 500 nm. Ils se différencient par leur structure :

- Les **vésicules multilamellaires (MLV)** : bicouches lipidiques concentriques séparées par des compartiments aqueux, la structure est semblable à un oignon.
- Les **vésicules multivésiculaires (MVV)** : vésicules constituées de plusieurs vésicules [105, 108].



*Figure 22 : Classification des liposomes en fonction de leur structure et leur taille. Liposomes possédant une seule bicouche lipidique : GUV, LUV et SUV ; et liposomes à plusieurs bicouches lipidiques : MLV et MVV [108].*

#### ◆ Classification des liposomes en fonction de leur composition

Les liposomes peuvent également être classés en fonction de leur composition. Au fil du temps, trois générations de liposomes se sont distingués : les liposomes **conventionnels**, **furtifs** et **immunitaires**.

### ◇ **Liposomes conventionnels**

Les liposomes **conventionnels** sont la **première génération** de liposome (*Figure 23*). Ils sont neutres ou négatifs et principalement composés de phospholipides et de cholestérol [108, 111]. Ils ont permis de réduire la toxicité des médicaments, mais sont trop rapidement éliminés du sang par le RES [112]. En conséquence, des liposomes stables et furtifs sont inventés permettant ainsi d'augmenter la durée de vie dans la circulation sanguine [111].

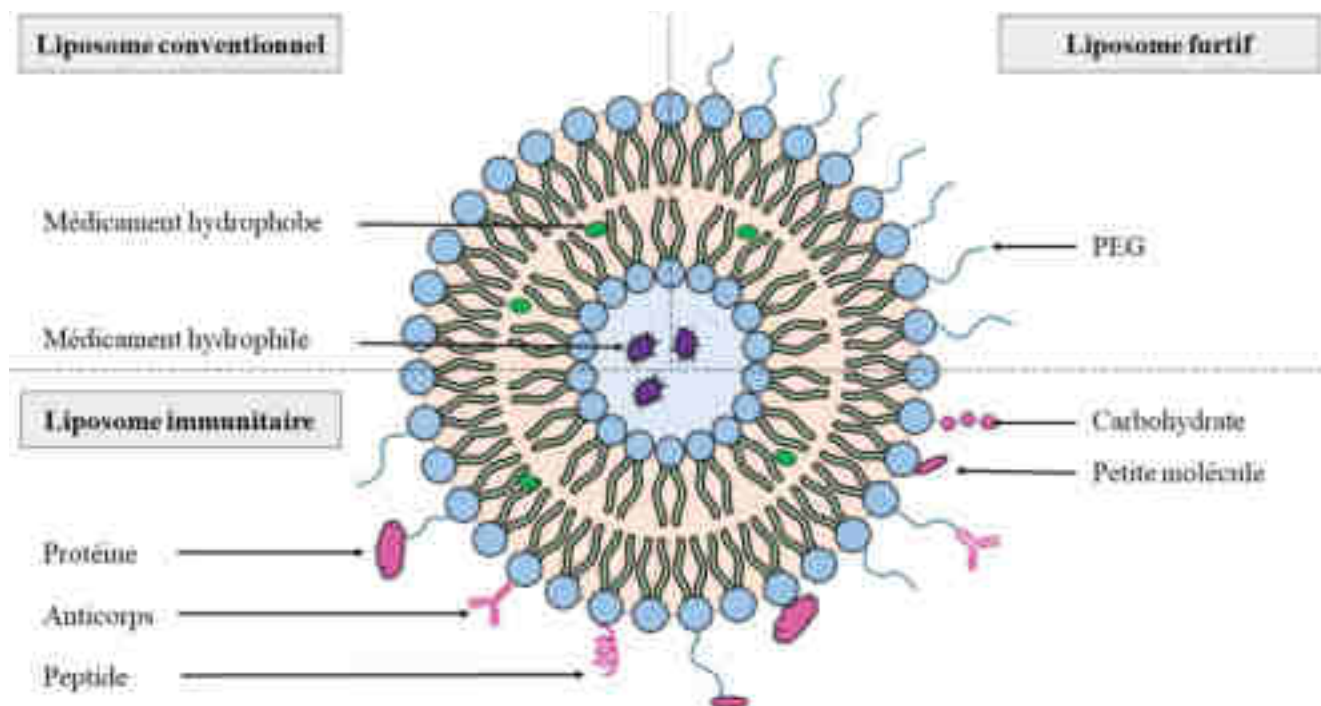
### ◇ **Liposomes furtifs**

Les liposomes **furtifs**, également appelés liposomes à **longue circulation** sont la deuxième génération de liposomes (*Figure 23*) [111]. Ils sont recouverts à leur surface par des molécules de polymères inertes tels que des glycoprotéines, des oligosaccharides et des polymères synthétiques [108]. Le plus utilisé est le PEG, l'incorporation de PEG dans les formulations est la stratégie la plus utilisée depuis les années 1990 [85]. Comme vu précédemment, les lipides-PEG permettent d'éviter l'élimination par le RES et d'améliorer la stabilité [105, 108]. Ils sont nommés liposomes furtifs étant capables d'échapper à la reconnaissance des macrophages et cellules T et d'éviter la clairance rapide par le système immunitaire [108].

### ◇ **Liposomes immunitaires**

Les liposomes **immunitaires** ou **ciblés** sont la troisième génération de liposomes (*Figure 23*). Des ligands spécifiques sont fixés à la surface des liposomes permettant un ciblage actif vers les tissus et organes cibles [108, 111]. Ce ciblage actif augmente l'interaction des liposomes et des cellules malades et déclenche l'endocytose médiée par les récepteurs du liposome. Des peptides, protéines, glucides, vitamines ou bien des anticorps peuvent être fixés sur les liposomes [111].





*Figure 23 : Représentation d'un liposome en fonction de ses trois générations. Liposome de première génération : conventionnel (en haut à gauche). Liposome de deuxième génération : furtif, recouvert de PEG (en haut à droite). Liposome de troisième génération : immunitaire, recouvert de divers ligands (en bas) [113].*

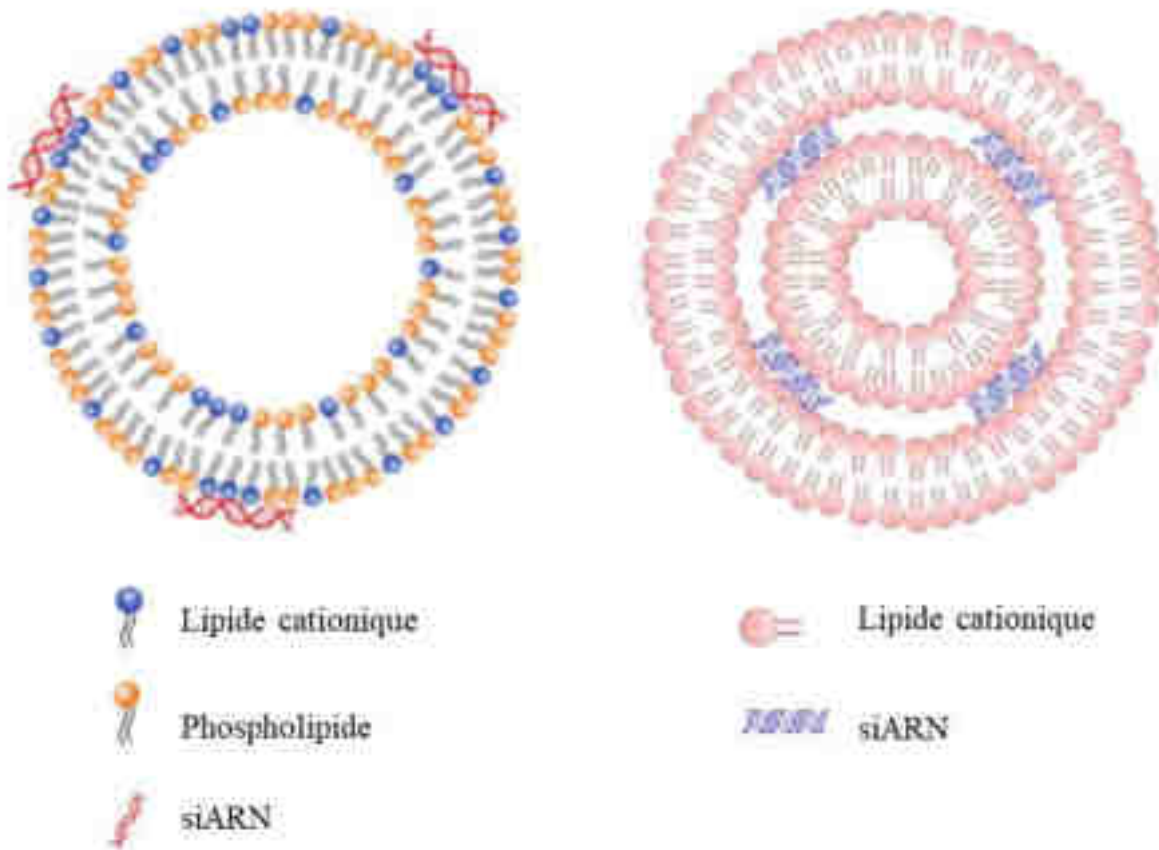
Les liposomes sont décrits pour la première fois dans les années 1960, après une étude des membranes biologiques par **Alec Bangham** et **Robert Horne** [97, 107]. Ils ont en effet montré que des lécithines d'œuf s'assemblent spontanément en structures vésiculaires multicouches lorsqu'elles sont introduites dans une solution aqueuse [85]. Les liposomes sont les premiers systèmes d'administration de nanomédicaments à avoir été développés avec succès en application clinique [104, 105]. Ils sont, dans un premier temps, utilisés pour les thérapies à petites molécules. Le **Doxil** est le premier nanomédicament approuvé par la FDA en 1995 pour le traitement de patients atteints d'un cancer de l'ovaire et du sarcome de Kaposi lié au SIDA [104, 106]. Il est composé de DSPC (56%), de cholestérol (38%) et de lipide-PEG (5%) et encapsule un agent anticancéreux : la doxorubicine [101]. Par la suite, de nombreux traitements utilisant des liposomes pour encapsuler de petites molécules ont été approuvés dans plusieurs domaines tels que le cancer (Myocet), les infections fongiques (Ambisome) et la gestion de la douleur (DepoDur) [97].

Les liposomes peuvent transporter différents types de produits thérapeutiques en plus des médicaments à petite molécule tels que les grosses protéines et les AN [93]. A la fin des années 1970, les premiers

AN sont encapsulés dans de grands liposomes unilamellaires à base de phosphatidylsérine par **Dimitraïdis** et son équipe [85, 107]. Des processus d'encapsulation passive utilisant des lipides neutres étaient utilisés pour l'administration de ces AN [106], mais l'efficacité de piégeage était relativement faible (<40%) et l'efficacité de transfection limitée [109]. Les techniques utilisées pour les médicaments à petite molécules ne pouvaient pas être appliquées pour les AN. Leur taille et leur densité élevée de charges négatives nécessitent des fonctionnalités lipidiques supplémentaires avec notamment des méthodes d'encapsulation active [101, 110]. C'est pourquoi des **liposomes cationiques** ont été développés, permettant ainsi d'améliorer l'encapsulation à l'aide d'interactions électrostatiques [93].

## b. Lipoplexes

Des lipides cationiques sont utilisés pour encapsuler de **manière active** les ON via les interactions électrostatiques (*Figure 24*) [78, 80]. Les lipides cationiques tels que le DOTMA et le DOTAP sont utilisés en combinaison avec des lipides neutres pour former les liposomes cationiques [103, 109]. Ces liposomes cationiques combinés aux ON forment des **lipoplexes** [100]. En 1987, la première démonstration de transfection à base de lipides cationiques a été réalisée par **Felgner** et son équipe en utilisant les lipides DOTMA [78, 107, 109]. En 1989, des lipoplexes basés sur DOTMA, pour l'administration d'ARNm de luciférase dans des cellules de souris, ont été réalisés par **Malon** et son équipe [107]. Cependant leur grande taille (souvent > 1 µm), leur instabilité, leur toxicité et leur charge de surface positive a limité leur utilisation in vivo [109, 110]. Les lipoplexes se caractérisent en effet par un piégeage incomplet des ON, ainsi qu'une mauvaise tolérance, une élimination rapide et des réponses immunitaires augmentées les excluant ainsi des études cliniques [80].



*Figure 24 : Différentes représentations de lipoplexes en fonction des publications. Les siARN se complexent aux lipides cationiques et forment des lipoplexes à simple bicouche lipidique (à gauche (101)) ou structure multilamellaire (à droite (114)).*

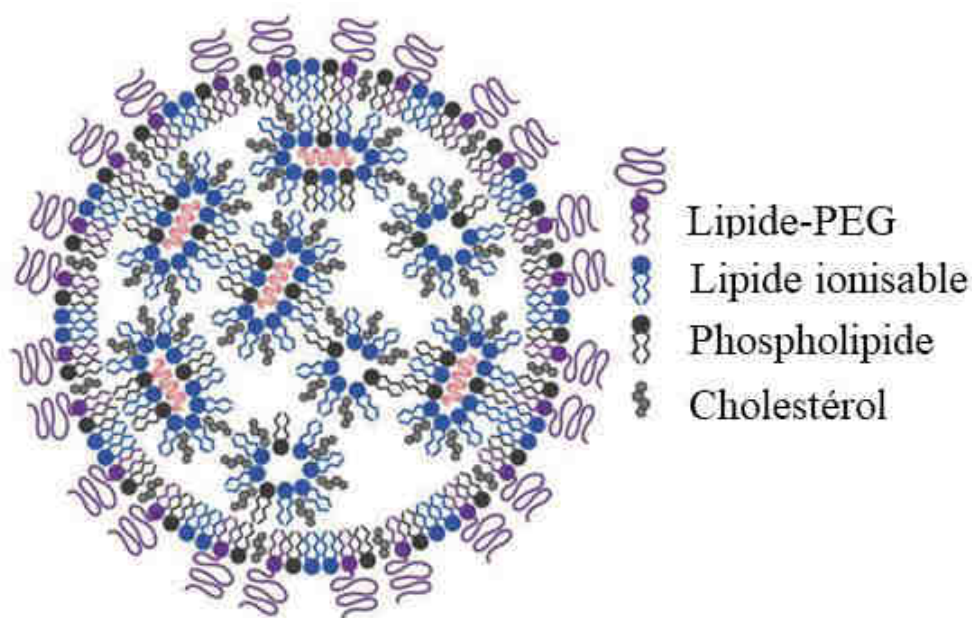
Tous ces efforts ont conduit à l'utilisation de **lipides ionisables** et au développement des **NPL**, le système le plus avancé et le seul validé cliniquement pour la délivrance d'ON [85].

### c. Nanoparticules lipidiques modernes

Le terme de **NPL** est apparu au début des années 1990 [105]. Les systèmes de NPL avancés sont différents des liposomes ne présentant qu'une seule couche externe de lipides dont les chaînes carbonées sont orientées vers le noyau (*Figure 25*) [106, 107]. Ce sont des vecteurs sphériques de moins de 100 nm composés de quatre lipides principaux : les phospholipides, les lipides cationiques ionisables, les lipides-PEG et le cholestérol [99, 115]. Les **lipides ionisables** sont les composants clés des NPL déterminant leur efficacité de transfection. Les lipides-PEG sont également très importants améliorant les temps de circulation ainsi que l'absorption cellulaire [106].

Les NPL se différencient également des liposomes par la présence de lipides au sein de leur noyau [115]. Elles forment des **structures micellaires inversées** dans le noyau dense aux électrons, encapsulant les ON [102, 107]. Elles nécessitent également des lipides ionisables non associés aux ON pour parvenir à une bonne évasion endosomale [110]. Cependant, l'arrangement lipidique dans le noyau, à la surface et autour des ON fait encore débat [101, 115].

Les NPL sont le système d'administration le plus prometteur, elles ont été un succès pour le développement de l'**Onpattro** et des **vaccins contre le COVID-19** [94]. Elles possèdent de nombreux avantages avec une petite taille nanométrique, une toxicité diminuée, une stabilité stérique et une bonne efficacité de délivrance avec un échappement endosomal favorisé. Cependant, elles possèdent également des inconvénients avec une faible biodistribution étant seulement fortement absorbées au niveau du foie et de la rate [102].



*Figure 25 : Représentation d'une NPL. NPL composée de lipides ionisables, phospholipides, cholestérol et lipides-PEG encapsulant des ON dans des structures micelles [93].*

## 4. Méthodes de fabrication

Il existe de nombreuses méthodes pour produire les différents types de vecteurs lipidiques dont des méthodes **conventionnelles** et des méthodes **modernes**. Quelques méthodes sont présentées ci-dessous.

### a. Méthodes conventionnelles

Les méthodes **conventionnelles** sont généralement des méthodes simples et faciles à utiliser à l'échelle du laboratoire [116], **l'hydratation en couche mince** et **l'injection d'éthanol** en font partie.

#### ◆ Hydratation en couche mince

**L'hydratation en couche mince** également appelée **méthode Bangham** est une procédure d'encapsulation passive, produite lorsque les phospholipides s'auto-assemblent spontanément. C'est l'une des techniques les plus utilisées pour produire des liposomes. Les lipides sont dissous dans un solvant organique, tel que l'éthanol, pouvant contenir des médicaments hydrophobes. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, formant ainsi une fine couche lipidique. Cette fine couche est ensuite réhydratée à l'aide d'une solution tampon aqueuse contenant les médicaments hydrophiles (*Figure 26*) [104, 117]. Les lipides s'auto-assemblent en vésicules GUV lors d'une hydratation douce et en MLV hétérogène lors d'une agitation intense [105, 116].

C'est la méthode la plus simple à réaliser, utilisant du matériel peu complexe et peu coûteux. Cependant, la taille des particules doit être homogénéisée et réduite par **sonication** ou **extrusion** pour former des LUV ou des SUV [117]. La sonication peut être réalisée à l'aide d'une sonde ou d'un bain. La taille des particules obtenues dépend du temps de sonication et de la composition lipidique [93, 111]. Lors de l'extrusion, la suspension hétérogène de particules traverse un filtre de taille de pores désignée. L'extrusion donne des particules plus homogènes que la sonication. Cependant, ces étapes nécessitent une certaine main d'œuvre pour une production à grande échelle [93, 117].

Malheureusement, l'hydratation en couche mince est une méthode non évolutive avec une efficacité d'encapsulation qui reste faible (de 3 à 45%). De plus, des traces de solvants peuvent subsister [108] et l'étape de sonication peut dégrader les médicaments et les lipides [111, 116] et également contaminer la solution avec des particules de titane [93, 116].

## ◆ Injection d'éthanol

L'**injection d'éthanol** est une autre technique permettant de produire des liposomes. Elle est développée pour la première fois par **Batzri** et **Korn** en 1973 comme alternative à la méthode d'hydratation en couche mince combinée à la sonication. Les lipides sont dissous dans de l'éthanol, puis injectés à débit rapide dans un tampon aqueux sous agitation (*Figure 26*). Les vésicules se forment en raison de l'augmentation de la polarité et la taille est contrôlée par le taux d'agitation, le taux d'injection, les types de lipides utilisés et leur concentration [93, 117].

L'**injection à flux croisé** est un autre type de méthode d'injection d'éthanol. Deux tubes en acier inoxydable forment une croix avec un petit trou d'injection situé à l'intersection des tubes. Une solution d'éthanol contenant des lipides est injectée dans une solution tampon à travers le tube à flux transversal [117]. Les particules produites sont de petites tailles à des débits élevés des flux de tampon aqueux. C'est également le cas à des pressions d'injection plus élevées de la solution d'éthanol [93].

Ces méthodes conventionnelles sont encore utilisées en raison de leur **simplicité**. Cependant, la lourdeur des processus, le manque d'évolutivité, d'efficacité d'encapsulation et de reproductibilité ont conduit à la création de nouvelles méthodes de production [93, 117].

## b. Nouvelles méthodes

Des processus de fabrication évolutifs et robustes sont cruciaux pour améliorer l'encapsulation des ON au sein de NPL. L'**utilisation de tube en T** et les **dispositifs microfluidiques** ont permis d'obtenir un niveau d'encapsulation élevé et d'augmenter la production à grande échelle [97, 116].

## ◆ Mélange à jonction T

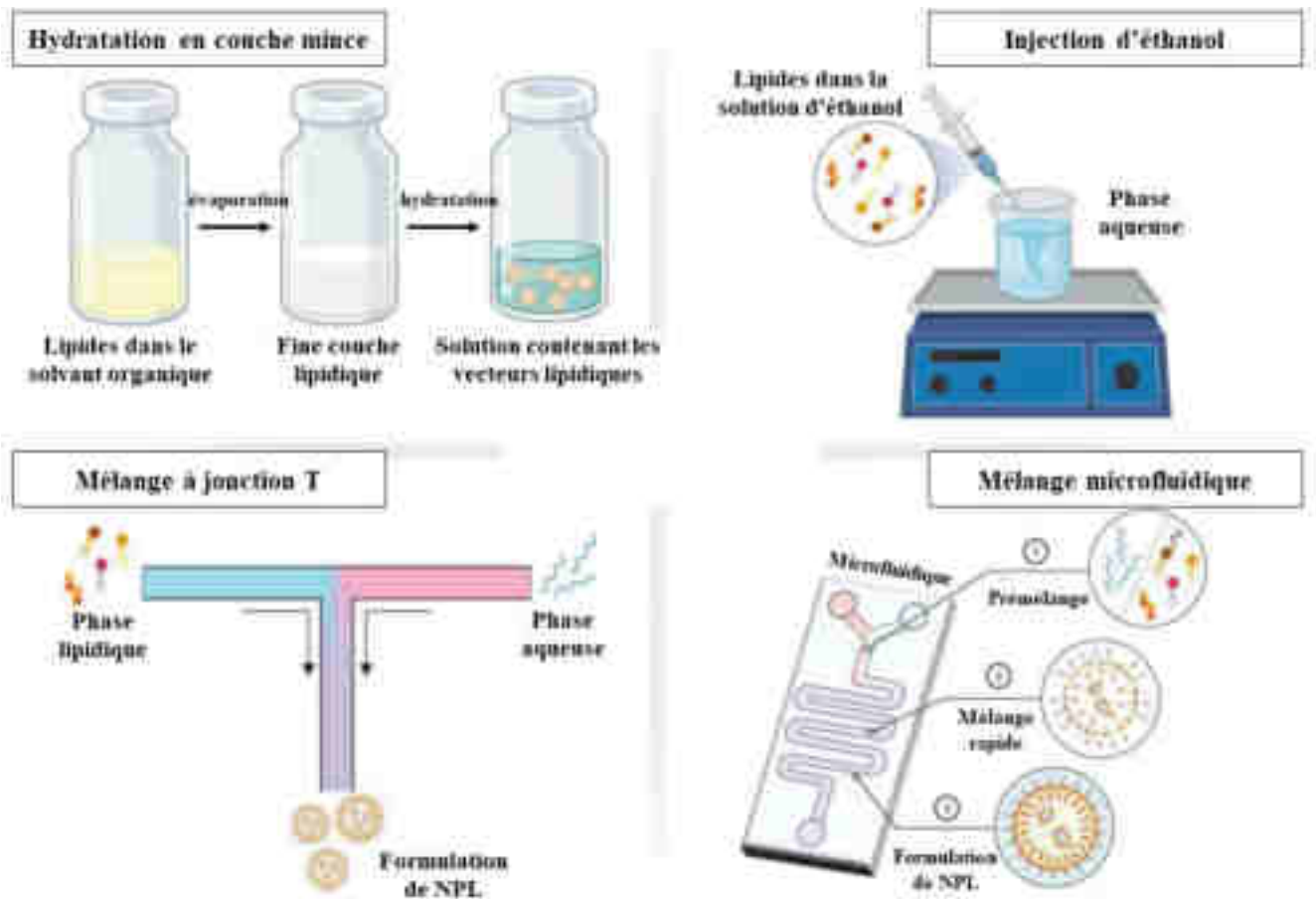
Cette méthode a été introduite en 1999 par **Hirota** pour produire des ADN-lipoplexes. Elle permet de produire des particules reproductibles, uniformes et de taille contrôlable [93, 116]. Les lipides sont dissous dans de l'éthanol et les ON dans un tampon aqueux (pH 4) [110], puis sont chacun injectés à une entrée du **tube en T** (*Figure 26*). Cela entraîne un mélange rapide lors de la collision des deux solvants, produisant ainsi un flux de sortie turbulent [116]. Les lipides précipitent à mesure que la polarité du solvant augmente entraînant ainsi la formation des particules [93].

C'est une méthode permettant une production à grande échelle et possédant une meilleure efficacité d'encapsulation que les méthodes conventionnelles. Elle nécessite cependant un débit élevé pour obtenir un mélange rapide, mélange dépendant également de la longueur du canal et de la surface de contact, et n'est donc pas privilégiée à l'échelle du laboratoire. Comme pour les autres méthodes, des traces de solvant organique peuvent subsister [116].

#### ◆ **Mélange microfluidique**

La microfluidique est une méthode utilisant des **canaux microscopiques**. Les lipides sont dissous dans de l'éthanol, puis la solution est injectée dans la direction opposée à la solution contenant les ON à l'intérieur des micro-canaux [111, 118]. Les micro-canaux possèdent un flux laminaire avec une diffusion lente à travers les canaux. Des **structures à chevrons décalés** ont été ajoutées par **Stroock** et al en 2002 (*Figure 26*). Cela a permis d'améliorer le mélange des solutions. Cette méthode de mélange chaotique a été utilisée pour la fabrication de NPL par le groupe de **Pieter Cullis** [117, 118].

Le développement des **puces microfluidiques** a amélioré l'encapsulation des ON ainsi que le contrôle de la procédure de mélange permettant ainsi un meilleur contrôle de la taille et de l'homogénéité des particules [117]. Des particules reproductibles, avec une taille, une morphologie et une lamellarité appropriées sont alors obtenues [111]. Des grandes quantités de solvants organiques sont cependant utilisées pouvant subsister [117].



*Figure 26 : Représentation de différentes méthodes de fabrication de vecteurs lipidiques. Méthodes conventionnelles : hydratation en couche mince (en haut à gauche) et injection d'éthanol (en haut à droite). Méthodes modernes : mélange à jonction T (en bas à gauche) et mélange microfluidique (en bas à droite) [117].*

Le développement de nouvelles méthodes de fabrication, de nouveaux modèles de vecteurs, ainsi que l'utilisation de lipides ionisables cationiques en combinaison aux lipides auxiliaires ont permis le développement du premier médicament à base de siARN encapsulé dans des NPL : l'**Onpattro**.



### III. Traitements utilisant les NPL modernes

La compréhension des différents mécanismes d'action, l'ajout de modifications chimiques, le développement de nouvelles méthodes de fabrication et la création de vecteurs lipidiques utilisant des lipides ionisables cationiques ont permis de pallier les problèmes rencontrés chez les ON.

En effet, comme vu précédemment, les siARN étaient trop gros et trop chargés pour pénétrer les cellules sans aide. La fabrication des nouveaux systèmes de NPL encapsulant les ON a entraîné la commercialisation d'un médicament : **l'Onpattro**, premier siARN sorti sur le marché.

Par la suite, la technique utilisant la GalNAc a également entraîné la commercialisation de médicaments à base de siARN. Cependant, l'Onpattro a été un modèle pour la création des **vaccins à ARNm contre le Covid-19**, les vaccins utilisant également des NPL à base de lipides ionisables cationiques.

#### 1. Onpattro (patisiran)

**L'Onpattro** (patisiran) est un **siARN** thérapeutique ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement de **l'hATTR** chez les adultes atteints de **polyneuropathies** de stade I ou II. Son principe actif, le **patisiran**, est un **ARN interférent** permettant d'induire la dégradation de l'**ARNm** codant la protéine **TTR** [119].

##### a. La maladie : l'amylose à transthyréine

**L'hATTR** est une maladie rare, autosomique dominante et progressive due à une anomalie génétique provoquant un **mauvais repliement des protéines TTR**. Ce mauvais repliement entraîne l'accumulation de ces protéines dans les différents tissus et organes du corps humain [120, 121, 122]. En l'absence de prise en charge et de traitements, la maladie devient invalidante et fatale [123].

##### ◆ Epidémiologie

**L'hATTR** est une maladie rare avec une prévalence mondiale d' $1/10^6$  et une prévalence européenne de  $0.47/10^6$  en 2014 selon la Haute autorité de santé. En France, environ 700 personnes sont diagnostiquées en 2014 [119], mais de plus nombreux cas sont recensés dans certains pays tels que la

**Suède** et le **Portugal** avec une prévalence d'environ 23/100 000 personnes pour ce dernier [124, 125]. Cependant, les progrès en diagnostic laissent penser que l'hATTR est plus fréquente qu'on ne le pense [126].

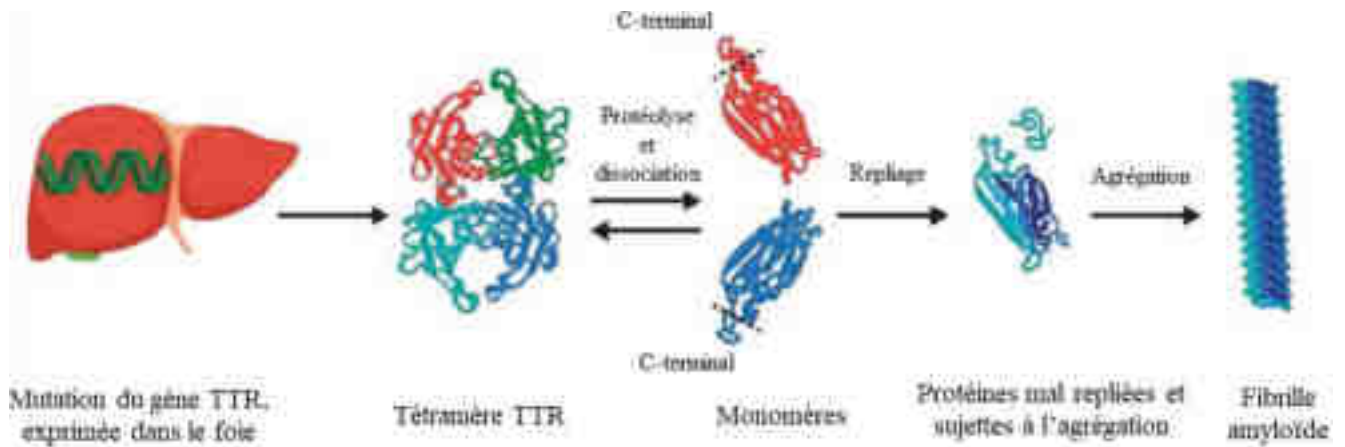
Cette maladie apparaît généralement entre 20 et 90 ans, avec un âge moyen de diagnostic de **68,1 ans** [121, 124]. La maladie étant grave, invalidante et d'évolution fatale, sans traitements, l'espérance de vie des patients est de **3 à 15 ans** après l'apparition des premiers symptômes [121, 127]. Malheureusement, les patients présentant une cardiomyopathie ne pourront espérer vivre que 2 à 5 ans seulement après leur diagnostic [128].

Le plus grand facteur de risque de développement de la maladie est l'**héritage génétique** [124]. Il existe cependant deux sortes d'ATTR : celle de type **sauvage** survenant à la suite du vieillissement et celle de type **héréditaire** due aux mutations génétiques sur le gène codant pour la TTR [129, 130].

#### ◆ Mutations

Plus de **130 mutations du gène TTR** ont déjà été recensées, dont la plupart sont dues à des substitutions nucléotidiques entraînant des mutations faux sens [124, 125, 129]. Les mutations donnent lieu à des variantes au niveau de la distribution géographique, de l'implication organique et du degré d'amyloïdogénicité [131]. La plus courante est la **Val30Met**, où la valine est remplacée par la méthionine en position 30 [125], mutation souvent associée à la polyneuropathie [124]. Les personnes atteintes de cette mutation et venant des zones endémiques ont un début précoce et une évolution clinique plus rapide [132, 133]. En Europe, la Val30Met est la mutation la plus répandue. Aux Etats-Unis, c'est la mutation **V122I** qui prédomine [134].

Les différentes mutations provoquent l'**instabilité** de la protéine TTR qui est alors incapable d'adopter sa structure normale et de se replier correctement [120]. La protéine TTR mutée est **dissociée** et les monomères mal repliés **s'agrègent**, entraînant la formation de **fibrilles amyloïdes** (*Figure 27*) [124, 127, 133]. Elles s'accumulent alors au niveau des **nerfs** du système nerveux périphérique et autonome, du **muscle cardiaque**, du **tractus gastro-intestinal** et d'autres organes [134, 135]. La maladie survient lorsque l'agrégation des fibrilles amyloïdes, insolubles et résistantes à la protéolyse [131], est suffisante pour perturber la structure, l'intégrité et la fonction de l'organe affecté [129]. Ces fibrilles peuvent endommager les tissus par compression, obstruction, toxicité cellulaire ou perturbation de la circulation sanguine locale [126].



*Figure 27 : Mutation du gène TTR entraînant la formation de fibrilles amyloïdes. Production par le foie d'une forme mutée de la protéine TTR. La mutation favorise le remodelage protéolytique et la déstabilisation de la protéine tétramère qui se dissocie alors en monomères. Formation de protéines amyloïdogènes mal repliées qui s'agrègent en fibrilles amyloïde [136].*

En absence de maladie, la TTR est normalement un **tétramère stable** et soluble, synthétisée principalement par le **foie**, permettant le transport de la **thyroxine** (hormone thyroïdienne) et du **rétiinol** (dérivé de la vitamine A) dans le plasma [127, 129, 134]. En plus du foie, la TTR est également synthétisée au niveau du **plexus choroïde** et de l'**épithélium pigmentaire** rétinien pour la sécrétion dans le liquide céphalorachidien et dans les yeux [125, 133, 137].

#### ◆ Symptômes

L'ATTR est décrite pour la première fois par **Corino Andrade en 1952** comme une forme particulière de neuropathie périphérique avec une faiblesse progressive des membres inférieurs, une atteinte gastro-intestinale et génito-urinaire, une perte de la sensation de la température et de la douleur [6]. Les **nerfs (neuropathie)** et le **cœur (cardiopathie)** sont les plus souvent atteints, mais d'autres organes tels que les **yeux** et les **reins** peuvent également être touchés [121, 123].

Différents symptômes sont visibles en fonction des organes et des tissus concernés [120, 137]. L'infiltration cardiaque peut provoquer une **cardiomyopathie** hypertrophique avec une augmentation de l'épaisseur et de la rigidité des parois du cœur, entraînant un essoufflement du patient. Elle peut également provoquer des troubles de conduction avec des blocs de branche et des arythmies. Une atteinte **oculaire** induit l'apparition de sécheresses, de glaucomes, d'opacités vitréennes, de troubles pupillaires et de mouches volantes [121, 123, 131]. Pour l'atteinte **rénale**, une protéinurie, un syndrome néphrotique et une insuffisance rénale sont des symptômes récurrents [126]. Enfin les patients présentent

une **neuropathie sensorimotrice et / ou autonome** [136]. La neuropathie autonome est caractérisée par une hypotension orthostatique, des troubles génito-urinaires et des troubles gastro-intestinaux [126, 127, 138]. La neuropathie sensorielle se manifeste par un engourdissement, une sensibilité thermique et une douleur altérée qui commence de manière distale au niveau des membres inférieurs et progresse de manière proximale pour atteindre les membres supérieurs [131, 136]. L'atteinte motrice déclenche des faiblesses musculaires et une altération de la marche avec des déséquilibres [121, 136, 138]. Généralement, les patients décèdent d'une **maladie cardiaque** (arythmie, mort subite) ou de **malnutrition** [126, 127].

#### ◆ Diagnostic

L'hATTR présentant une forte **variabilité phénotypique** et une **atteinte multiviscérale**, le diagnostic peut être long et les erreurs fréquentes [132]. Le diagnostic est établi sur trois piliers de base : les symptômes, la confirmation histologique des dépôts amyloïdes et l'analyse génétique [131]. Le médecin commence par un **entretien** avec le patient pour mettre en évidence ses antécédents familiaux et ses différents symptômes [124]. Après le recueil de ces informations, une **biopsie** peut être réalisée pour démontrer la présence des dépôts anormaux d'amyloïde [123, 125, 139]. Mais la distribution inégale des dépôts peut rendre cette étape compliquée, les biopsies étant alors souvent répétées [126]. Enfin, pour déterminer la mutation présente chez le patient, un **test génétique** à l'aide d'une prise de sang est réalisé [123, 139].

Le stade de l'hATTR peut également être déterminé par le praticien. Tant que le patient est capable de marcher sans aide, la polyneuropathie est qualifiée de **stade I**. Cependant, lorsque le patient a besoin d'aide pour se déplacer, la maladie est qualifiée de **stade II** (généralement après 5 ans). Enfin, quand le patient n'est plus capable de se déplacer, la maladie est qualifiée de **stade III** (généralement après 10 ans) [119, 133].

#### ◆ Prise en charge

L'ATTR nécessite une prise en charge **pluridisciplinaire** avec un neurologue, un cardiologue, un ophtalmologue, un généticien, ... [123]. La prise en charge de la maladie comprend des traitements symptomatiques visant à réduire les troubles urinaires, digestifs, neurogènes [119] et des traitements visant à interrompre ou ralentir les lésions secondaires aux dépôts de fibrilles [125]. Pour traiter les

patients, il existe trois solutions : **réduire** la quantité de TTR produite, **prévenir** le mauvais repliement de la TTR, ou bien **éliminer** la TTR déjà déposée (*Figure 28*).

Le patient en **phase précoce** peut avoir recours à une **transplantation hépatique** (*Figure 28*), le foie étant le principal organe producteur de TTR [124]. Elle est établie depuis 1990 et entraîne la réduction de production de TTR mutée. Cependant, c'est une opération contraignante et cette solution est seulement efficace chez certains patients comme ceux présentant la mutation Val30Met sans atteinte cardiaque [127, 136, 137]. De plus, elle ne permet pas d'inverser les dommages causés par les dépôts de TTR [121]. Des greffes rénales et cardiaques sont également réalisées chez les patients les plus atteints [119, 127].

Les **stabilisateurs** de TTR (**tafamidis** et **diflunisal**) (*Figure 28*) peuvent également être utilisés chez les patients atteints d'hATTR en phase I [119]. Le diflunisal est un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé hors AMM pour l'ATTR [127, 140]. Le Vyndaqel (tafamidis) quant à lui possède une AMM pour traiter l'ATTR avec cardiomyopathie. Ils ralentissent légèrement la progression de la maladie, mais pas son évolution à long terme [127, 128], en **empêchant la dissociation des tétramères** et donc la formation de fibrilles [136]. Comme pour la greffe hépatique, ils ne permettent pas d'inverser les dommages causés par les dépôts de TTR [121]. Le diflunisal peut également provoquer des effets indésirables graves tels que des troubles gastro-intestinaux et rénaux, pouvant empêcher l'utilisation du médicament chez certains patients.

Les nouveaux traitements ON (**inotersen**, **patisiran** et **vutrisiran**) (*Figure 28*) permettent de bloquer la majorité de la production de TTR par les cellules du foie en **inhibant sa transcription**. Ils ont montré une efficacité chez les patients à un **stade précoce et avancé** pour ralentir la progression de la maladie [139]. Cependant, l'inotersen n'améliore pas les variables écho-cardiographiques [124] et des risques accrus de thrombocytopenie et de glomérulonéphrite sont présents [136].

Enfin, la **destruction des dépôts de fibrilles** est une voie envisagée, aucun traitement n'ayant encore été approuvé cliniquement. La **doxycycline** en combinaison avec **l'acide tauro-ursodésoxycholique** (TUDCA) (*Figure 28*) entraînerait la dégradation des dépôts et ainsi la stabilisation de la progression de l'atteinte cardiaque et neurologique. Cependant, l'étude est réalisée sur un trop petit nombre de personnes pour amener à une conclusion [126, 141]. **L'épigallocatechine-3-gallate** (EGCG) (*Figure 28*), catéchine présente dans le thé vert, pourrait inhiber la formation des fibrilles et rompre celles déjà préformées. Enfin, des **anticorps** monoclonaux (*Figure 28*) seraient également une solution pour cibler la protéine sous forme fibrillaire et l'éliminer [139, 141].

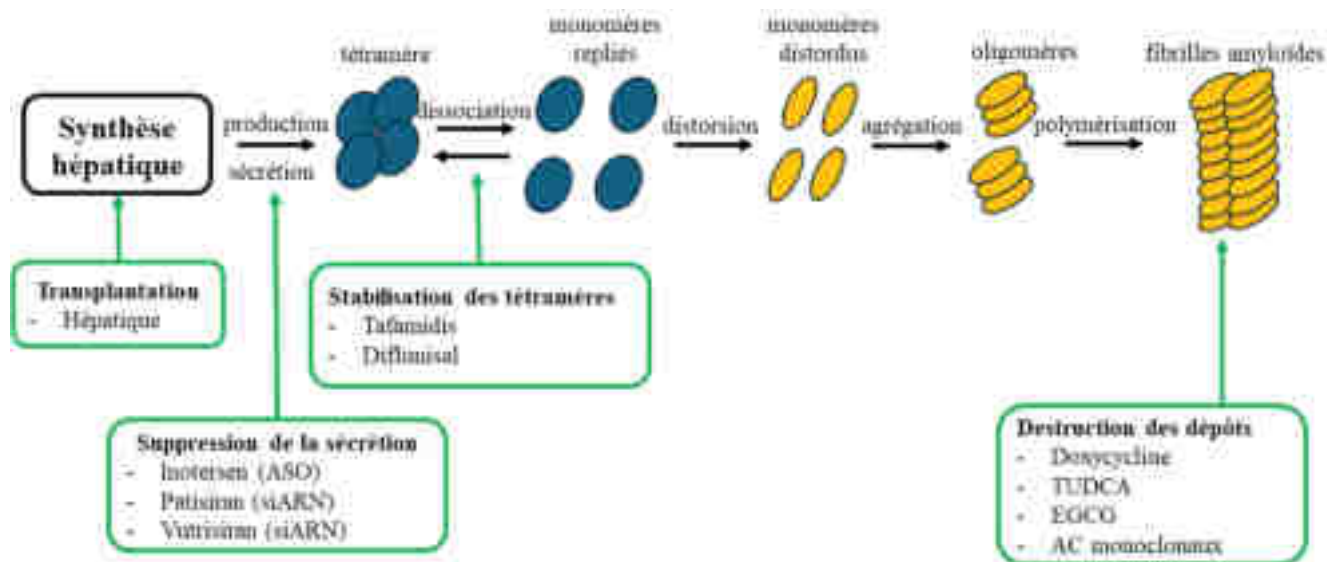


Figure 28 : Les différents traitements de l'ATTR. Représentation des trois types de traitements : suppression de la production de TTR, stabilisation des tétramères et élimination des dépôts (anticorps (AC)) [141].

## b. Le médicament : Onpattro (patisiran)

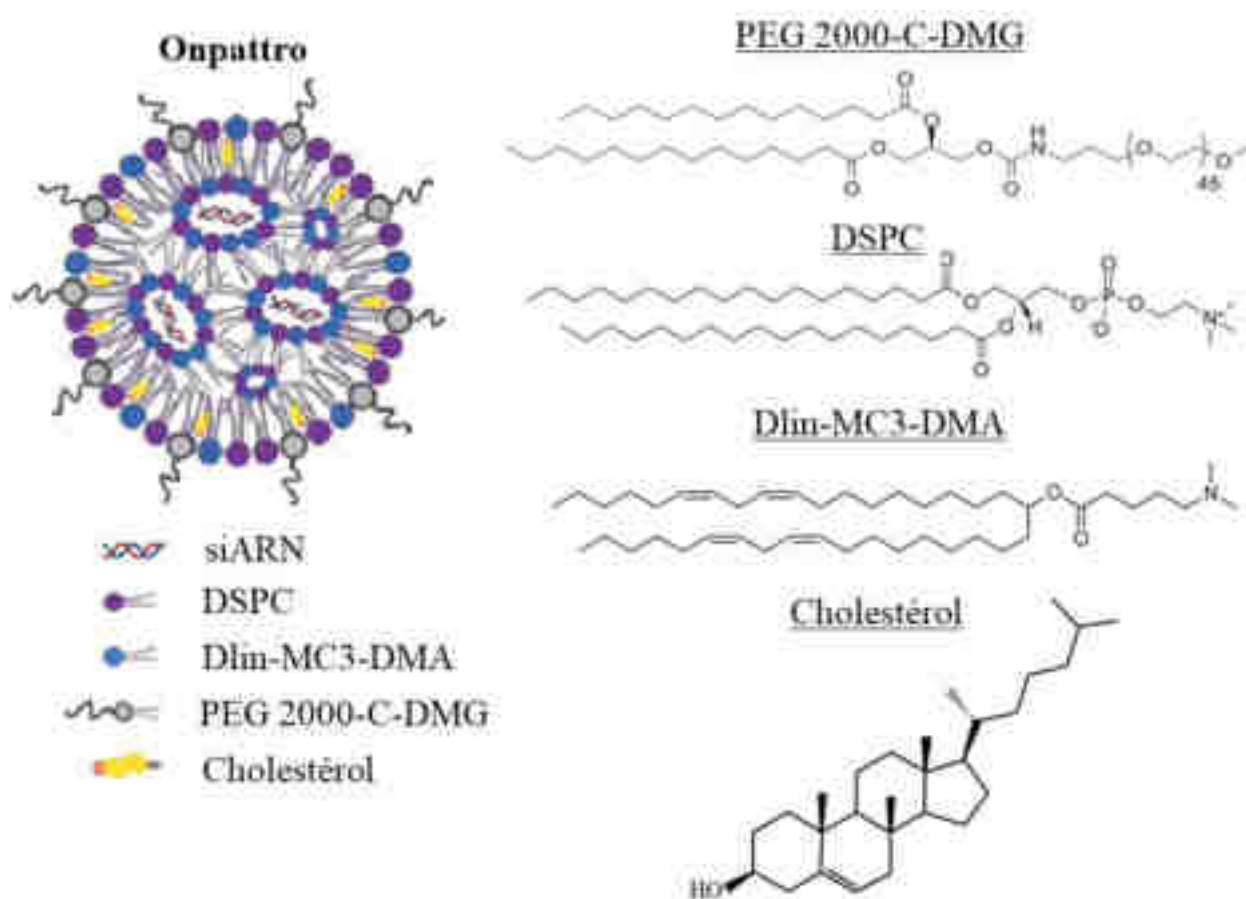
L'**Onpattro** (patisiran) est un **agent thérapeutique d'interférence ARN**, mécanisme permettant de contrôler l'expression des gènes [128], approuvé aux Etats-Unis et en Europe en 2018 dans le cadre de **polyneuropathies causées par l'hATTR** [122, 139, 142]. Il est conçu à l'aide de NPL qui protègent les siARN de la dégradation par les nucléases et facilitent la délivrance au sein des hépatocytes [134]. Celui-ci utilise un siARN **supprimant la synthèse de la TTR**, améliorant ainsi la neuropathie, les effets indésirables cardiaques et la qualité de vie du patient [124, 143].

### ◆ Modèle de l'Onpattro : NPL et ON utilisés

Une **NPL** renferme le principe actif de l'Onpattro (*Figure 29*) : le **patisiran sodique** ( $C_{414}H_{480}N_{148}Na_{70}O_{290}P_{40}$ ) [124], également nommé **ALN-183228** [134], à une quantité de 2,0 mg/mL [76]. C'est un siARN formé de deux simples brins partiellement complémentaires contenant chacun 21 nucléotides [134]. Pour augmenter l'efficacité du siARN, des modifications lui ont été apportées permettant d'améliorer la stabilité thermodynamique dans le duplex d'ARN et d'éviter ainsi les effets hors cibles. Le patisiran contient **onze modifications 2'-OMe** et **quatre modifications 2'desoxy**

**thymidine** à l'extrémité 2' de ses 2 brins [124, 127, 144, 145]. Ses modifications 2'-OMe-Uridine et Cytosine suppriment la réponse immunitaire innée et atténuent l'effet hors cible [146].

Ce siARN est incorporé au sein d'une **NPL** de deuxième génération. Les NPL utilisées possèdent une charge presque neutre au pH biologique et mesurent 60 à 100 nm [76]. Les NPL sont composées de quatre lipides : le **DLin-MC3-DMA**, le **DSPC**, le **cholestérol** et le **PEG 2000-C-DMG** (*Figure 29*) dans un rapport molaire de 50/10/38,5/1,5 [145]. Comme vu précédemment, les phospholipides DSPC et le cholestérol sont des lipides auxiliaires utilisés pour améliorer la formation et la stabilité physico-chimique des NPL [76, 134]. Le PEG 2000-C-DMG augmente quant à lui la stabilité et le temps de circulation des NPL, permettant une absorption du patisiran au **niveau du foie**. Enfin, le **lipide cationique ionisable DLin-MC3-DMA** induit une meilleure formulation, absorption cellulaire et libération endosomale du siARN [134].



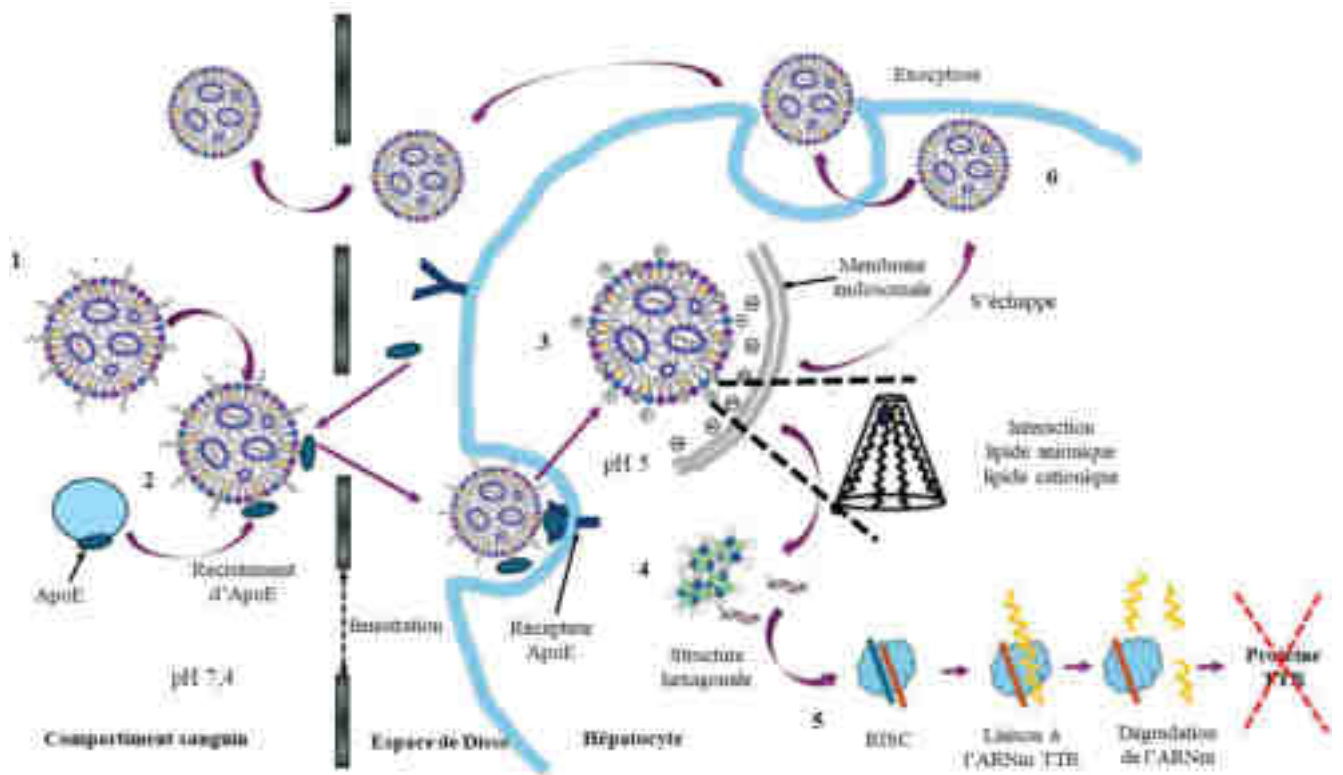
*Figure 29* : Représentation de l'Onpattro et de ses composants. NPL composée de PEG 2000-C-DMG, DSPC, DLin-MC3-DMA et cholestérol renfermant le patisiran (siARN). Le DLin-MC3-DMA possède un groupe de tête amine tertiaire, un linker ester et deux queues linoléyles [101, 147, 148, 149].

#### ◆ Mécanisme d'action

Le patisiran exerce son mécanisme d'action en tant qu'agent d'interférence ARN **en inhibant spécifiquement la synthèse hépatique de la TTR** [128, 142]. Dans un premier temps, le patisiran est administré par perfusion intraveineuse et arrive dans le sang où ses lipides modifiés par le PEG sont remplacés par des protéines sériques : **ApoE** (*Figure 30*). Les ApoE interagissent avec les composants cholestérol de la NPL et dirigent le médicament vers le foie [124]. Les protéines sériques, opsonisées dans la capsule lipidique de la NP, sont reconnues par les récepteurs de l'ApoE à la surface des hépatocytes et s'y lient pour pénétrer au sein du cytoplasme par **endocytose** (*Figure 30*) [134, 143].

Au sein des endosomes, les lipides ionisables sensibles au pH deviennent **cationiques**, fusionnant avec la membrane endosomale, permettant ainsi la rupture de l'endosome et la libération des siARN dans le cytoplasme (*Figure 30*) [124]. Le **RISC** se fixe aux siARN, liant le brin antisens et libérant le brin sens, fonctionnant alors comme une séquence de ciblage pour la séquence complémentaire à l'ARNm [143]. Il se lie à une séquence génétiquement conservée dans la région 3' non traduite de l'ARNm de la TTR de type sauvage et muté [122, 127, 144, 146]. Cette liaison active la **protéine Ago2 du RISC**, qui **clive l'ARNm** le rendant non fonctionnel (*Figure 30*) [124, 136]. Cela induit la réduction des niveaux de protéines TTR mutées et sauvages dans le sérum et son dépôt dans les tissus et organes [134, 142 et 143].





*Figure 30 : Mécanisme d'action du patisiran 1. Le patisiran est administré par voie intraveineuse. 2. Le lipide PEG se dissocie de la NPL et laisse place à l'ApoE. Cette association favorise la pénétration dans les hépatocytes, les NPL sont internalisées par endocytose. 3. Dans l'endosome, le lipide ionisable est protoné, grâce à la diminution de pH. La charge positive de la NPL lui permet d'interagir avec le lipide endosomal chargé négativement. 4. L'interaction entre les lipides induit la désintégration de la NPL, la déstabilisation de la membrane endosomale et la libération du patisiran dans le cytoplasme. 5. Le patisiran se lie au RISC et entraîne ainsi la dégradation de l'ARNm du TTR. La quantité de protéines TTR mutées et sauvages est alors réduite. 6. Certaines NPL internalisées subissent une évacuation par exocytose vers la circulation [134, 136, 147].*

#### ◆ Etudes cliniques

L'efficacité, la sécurité et la tolérabilité du patisiran ont été évaluées au cours **d'études cliniques**. Tout d'abord, deux études de phase I à dose unique croissante ont été réalisées chez des volontaires sains et malades, puis une étude de phase II à doses multiples croissantes chez des patients atteints d'hATTR. Enfin deux études de phase III, nommées **APOLLO** et **NTC1960348** ont vu le jour [136].

Dans la première étude de **phase I (ALN-TTR01)**, le siARN est encapsulé dans une NPL de première génération (lipide ionisable : DLin-DMA). Dans la deuxième étude (**ALN-TTR02**), le siARN est

formulé dans une NPL de deuxième génération (lipide ionisable : DLin-MC3-DMA). Ce sont des études randomisées, en simple aveugle, à dose unique, contrôlées par placebo, permettant d'évaluer l'innocuité et les effets sur les taux de TTR. ALN-TTR01 est administrée à huit groupes de quatre personnes atteintes d'ATTR à des doses croissantes allant de 0,001 à 1 mg/kg. ALN-TTR02, nommée par la suite patisiran, est administrée à quatre groupes de quatre volontaires sains à des doses croissantes allant de 0,01 à 0,5 mg/kg. Une diminution rapide, dose dépendante et durable des taux de TTR est observée chez les patients traités par ALN-TTR02, avec une réduction moyenne des taux de TTR de 82,3% pour la dose de 0,15 mg/kg et de 86,6% pour la dose de 0,3 mg/kg [127, 150].

Par la suite, une étude de **phase II** chez des adultes présentant une hATTR avec polyneuropathie est réalisée. Les patients sont divisés en neuf cohortes de trois/quatre personnes chacune. Dans les cohortes 1 à 3, des doses de 0,01 (cohorte 1), 0,05 (cohorte 2) et 0,15 (cohorte 3) mg/kg sont administrées une fois toutes les quatre semaines. Dans les cohortes 4 et 5, une dose de 0,3 mg/kg est administrée toutes les quatre semaines. Enfin, dans les cohortes 6 à 9, une dose de 0,3 mg/kg est injectée toutes les trois semaines. La réduction maximale des taux de TTR est observée dans les cohortes 6 à 9 avec 82,9% de diminution après la première dose et 86,7% après la deuxième dose [125, 127, 134].

**APOLLO**, essai clinique de phase III, est la plus grande étude réalisée sur des patients atteints d'hATTR. C'est une étude randomisée en double aveugle et contrôlée par placebo, d'une durée de 18 mois [139, 140]. 225 patients venant de 19 pays différents sont répartis en deux groupes distincts : le groupe recevant une dose de 0,3 mg/kg de patisiran (148) et le groupe recevant le placebo (77). L'efficacité du patisiran est évaluée à l'aide du critère principal suivant : **modification du score modifié de déficience neuropathique + 7 (mNIS+7)**. C'est une mesure de 0 à 304 points développée pour quantifier le spectre de la neuropathie sensorielle, motrice et autonome dans l'ATTR (les scores les plus élevés indiquant une plus grande déficience). Des critères secondaires tels que la qualité de vie, la force motrice et l'état nutritionnel ont également été évalués [127, 128, 136, 140]. Finalement, le patisiran a entraîné une réduction moyenne de la concentration de TTR d'environ 84,3% à 18 mois avec une amélioration de la polyneuropathie et de certains paramètres cardiaques (ex : réduction de l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche) [127, 136, 143, 151]. 56% des patients sous patisiran présentaient une amélioration du score mNIS+7 contre 4% pour les patients sous placebo. Les réductions de la TTR étaient comparables quel que soit l'âge, le sexe, la race, le type de mutation, le poids et la fonction rénale ou hépatique [127, 143]. De plus, il est bien toléré avec seulement quelques effets indésirables d'intensité légère à modérée.

Ces études ont conclu à un **rapport bénéfice/risque** acceptable avec une qualité de vie, une force motrice, une vitesse de marche et un état nutritionnel améliorés et ont déterminé le profil d'administration du patisiran. Il est perfusé par voie intraveineuse toutes les trois semaines à une

posologie de 0,3 mg/kg pour tous les patients de moins de 100 kg et de 30 mg pour ceux de plus de 100 kg pendant une durée d'environ 80 minutes [124, 134]. Des réactions liées à la perfusion sont cependant observées, c'est pourquoi une **prémédication** composée d'un corticostéroïde, d'un anti-H1 et d'un anti-H2 par voie intraveineuse, ainsi que du paracétamol par voie orale [124, 139] est administrée au moins 60 minutes avant le début de la perfusion [124, 143]. Cette prémédication en plus d'une perfusion lente au goutte à goutte, permettent de réduire les effets indésirables [146]. Les patients doivent également se supplémenter en vitamine A, toute production de TTR (sauvage et mutante) étant arrêtée pour éviter la progression de la maladie [6].

Après la commercialisation de l'Onpattro, d'autres siARN ont vu le jour : le givosiran, lumasiran, inclisiran et le vutrisiran. Cependant, aucun d'entre eux n'est encapsulé dans une NPL. Ils sont tous conjugués à la **GalNAc** permettant également une administration ciblée aux hépatocytes. La GalNAc est un dérivé du galactose se liant au récepteur de l'asialoglycoprotéine sur les hépatocytes conduisant à une absorption spécifique médiée par la clathrine. Le dernier siARN approuvé, le **vutrisiran**, est lui aussi utilisé dans le traitement de l'ATTR. Le but de ce nouveau médicament est d'augmenter l'administration hépatique et la puissance de dégradation de l'ARN, d'utiliser des doses plus faibles à des intervalles de temps moins fréquents et de réduire les effets indésirables. Aucune supériorité du vutrisiran par rapport au patisiran n'a été mise en évidence, seulement une non-infériorité. L'Amvuttra est donc un traitement de seconde intention, l'Onpattro restant la **première intention**. Le vutrisiran a tout de même permis de réduire la posologie (une dose tous les trois mois), d'être utilisé en sous cutanée (plus facile et confortable pour le patient) et de réduire les effets indésirables dus à la perfusion (ne nécessite pas de prémédication) [130, 152]. La GalNAc tend donc à remplacer les NPL, mais l'Onpattro a tout de même été un modèle pour la fabrication des **vaccins à ARNm** contre le covid-19, vaccins utilisant des **NPL**.

## 2. Vaccins à ARNm contre le Covid-19

Au cours des deux dernières décennies de nombreuses **épidémies virales** ont vu le jour : le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) en 2002, la grippe H1N1 en 2009, le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) en 2012, la maladie à virus Ebola en 2013, le virus Zika en 2015 et le SARS-CoV-2 en 2019 [153]. Les épidémies ne cessent d'apparaître et de se propager, c'est pourquoi il est important d'être capable de réagir efficacement dans l'urgence. Les **vaccins à ARNm** sont une solution étant développés très rapidement, les avancées réalisées sur les

NPL et la commercialisation de l'Onpattro ont permis la mise sur le marché de ces technologies pour lutter contre le **Covid-19**.

### **a. La maladie : le Covid-19**

Fin décembre 2019, une pneumologie d'étiologie inconnue est détectée dans la ville chinoise de Wuhan et se propage rapidement dans un premier temps à la Thaïlande, la Corée du Sud, Singapour, ... pour s'étendre par la suite au monde entier [154, 155, 156]. Une **nouvelle souche du coronavirus** est à l'origine de cette épidémie. Le 12 janvier 2020, elle est provisoirement nommée « nouveau coronavirus 2019 » par l'**Organisation Mondiale de Santé** (OMS). Le 30 janvier 2020, cette épidémie est annoncée comme urgence de santé publique de portée internationale. Le 11 février 2020, le comité international de taxonomie des virus le rebaptise SARS-CoV-2 en raison de sa similitude avec le précédent SARS-CoV. Il est finalement abrégé Covid-19 par l'OMS. Enfin, le 11 mars 2020, la **pandémie** mondiale est déclarée [153, 156, 157, 158].

#### **◆ Epidémies à coronavirus**

La famille des **Coronaviridae** est identifiée pour la première fois en 1965 chez des patients atteints de rhumes. Elle a déjà causé de nombreux dommages, les types de Covid les plus graves ayant entraînés des épidémies à grande échelle avec le **SARS-CoV** en 2002 et le **MERS-CoV** en 2012 [154, 158, 159]. Le SARS-CoV est identifié pour la première fois en novembre 2002 en Chine et progresse dans une trentaine de pays infectant 8 000 personnes avec un taux de mortalité d'environ 10%. Le MERS-CoV est lui identifié en 2012 à Djeddah en Arabie Saoudite. En 2013, environ 2 000 patients sont infectés avec un taux de mortalité de 36%. Les **chauves-souris**, les **civettes des palmiers masquées** et les **dromadaires** sont les hôtes potentiels de ce virus (*Tableau 6*) [154, 159, 160].

Le 15 août 2023, 769 774 646 cas sont déclarés avec 6 955 141 décès dans le monde. En France à la même date, 38 997 490 personnes sont contaminées et 167 985 en sont décédées [161].

	SARS-CoV	MERS-CoV	SARS-CoV-2
Date début épidémie	Novembre 2002	Avril 2012	Décembre 2019
Lieu commencement	Guangdong, Chine	Djeddah, Arabie Saoudite	Wuhan, Chine
Réservoir animal	Chauves-souris, civettes des palmiers masquées	Chauves-souris, dromadaire	Chauves-souris, pangolins
Nombre de cas	8 096	2 609	767 518 723
Nombre de décès	744	939	6 947 192
Taux de mortalité	10%	36 %	1%
Pays concernés	26	27	214
Taux de transmission	3	<1	3-4

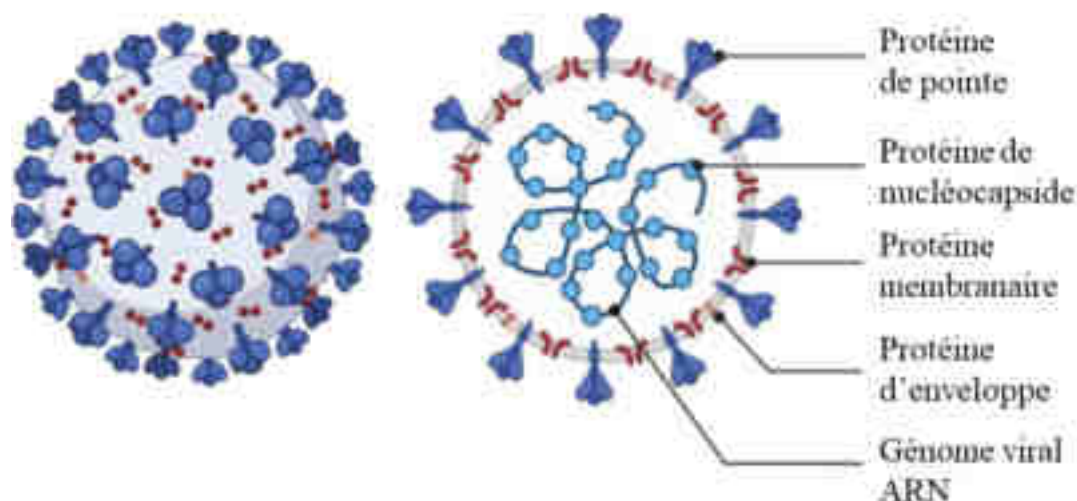
*Tableau 6 : Comparatif des différents Covids. Nombre de cas et de décès du SARS-CoV-2 à la date du 28 juin 2023 [159].*

#### ◆ Virus : modèle et mécanisme d'action

Le Covid-19 appartient à l'ordre des Nidovirales, à la famille des Coronavirinae et au genre des Betacoronavirus [154, 158, 159, 160]. C'est un **virus à ARN** simple brin de sens positif empaqueté dans une enveloppe membranaire d'un diamètre moyen de 75 à 150 nm. Il possède un grand génome avec une taille d'environ 30 kilobases [153, 157, 159, 160]. Son enveloppe est recouverte de glycoprotéines donnant aux coronavirus son **aspect de couronne** d'où son nom (corona signifiant couronne en latin) (*Figure 31*) [153, 154, 157, 159].

Le Covid-19 est un virus sphérique composé de différentes protéines structurales dont quatre principales (de l'extérieur à l'intérieur) : la **glycoprotéine de pointe (S)**, la **protéine d'enveloppe (E)**, la **protéine membranaire (M)** et la **protéine de nucléocapside (N)** (*Figure 31*) [153, 154, 157, 160]. La protéine S est la plus immunogène et donc la cible des anticorps inhibant l'infection virale. La protéine M est la plus grande et la plus abondante, elle définit la forme du virus et joue un rôle dans le processus de

bourgeonnement. La protéine E est essentielle à l'infection et également à la réplication du virus. Ensemble, elles forment l'enveloppe virale du Covid-19. Enfin, la protéine N, également essentielle à la réplication virale, est associée à l'ARN génomique et maintient le matériel génétique à l'intérieur de l'enveloppe (*Figure 31*) [157].



*Figure 31* : Représentation du Covid-19. Le Covid-19 est un virus sphérique, recouvert de protéine de surface lui conférant un aspect de couronne. Les protéines S, E et M forment l'enveloppe, la protéine N maintient l'ARN dans celle-ci [153].

La réplication du Covid-19, comme tout autre virus, nécessite une cellule hôte et comporte plusieurs étapes. La glycoprotéine de surface S se lie à **l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)**, récepteur situé sur la membrane plasmique de la cellule hôte, favorisant ainsi son invasion (*Figure 32 - 1*) [153, 156, 160]. La glycoprotéine de pointe est constituée de deux sous unités : S1 permettant la liaison et S2 assurant la fusion [157, 160]. Après **endocytose** du virus, le génome viral est libéré et traduit en **polyprotéines virales** par le ribosome de l'hôte (*Figure 32 - 2 et 3*). Les polyprotéines virales sont ensuite clivées en protéines effectrices par des protéinases. Une **matrice d'ARN à brin négatif** est synthétisée par l'ARN polymérase qui est utilisée pour produire davantage d'ARN génomique viral (*Figure 32 - 4*). Ce génome viral est ensuite synthétisé par réplication génomique et les **quatre protéines virales structurelles** sont produites par transcription puis traduction (*Figure 32 - 5*). Les protéines S, E et M sont intégrées dans la membrane du réticulum endoplasmique formant le **compartment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi (ERGIC)** (*Figure 32 - 6*). La protéine N se lie quant à elle à l'ARN génomique, et sont par la suite encapsulés et transportés par l'ERGIC vers la membrane plasmique, où le virus fille est libéré par **exocytose** (*Figure 32 - 7, 8 et 9*) [153].

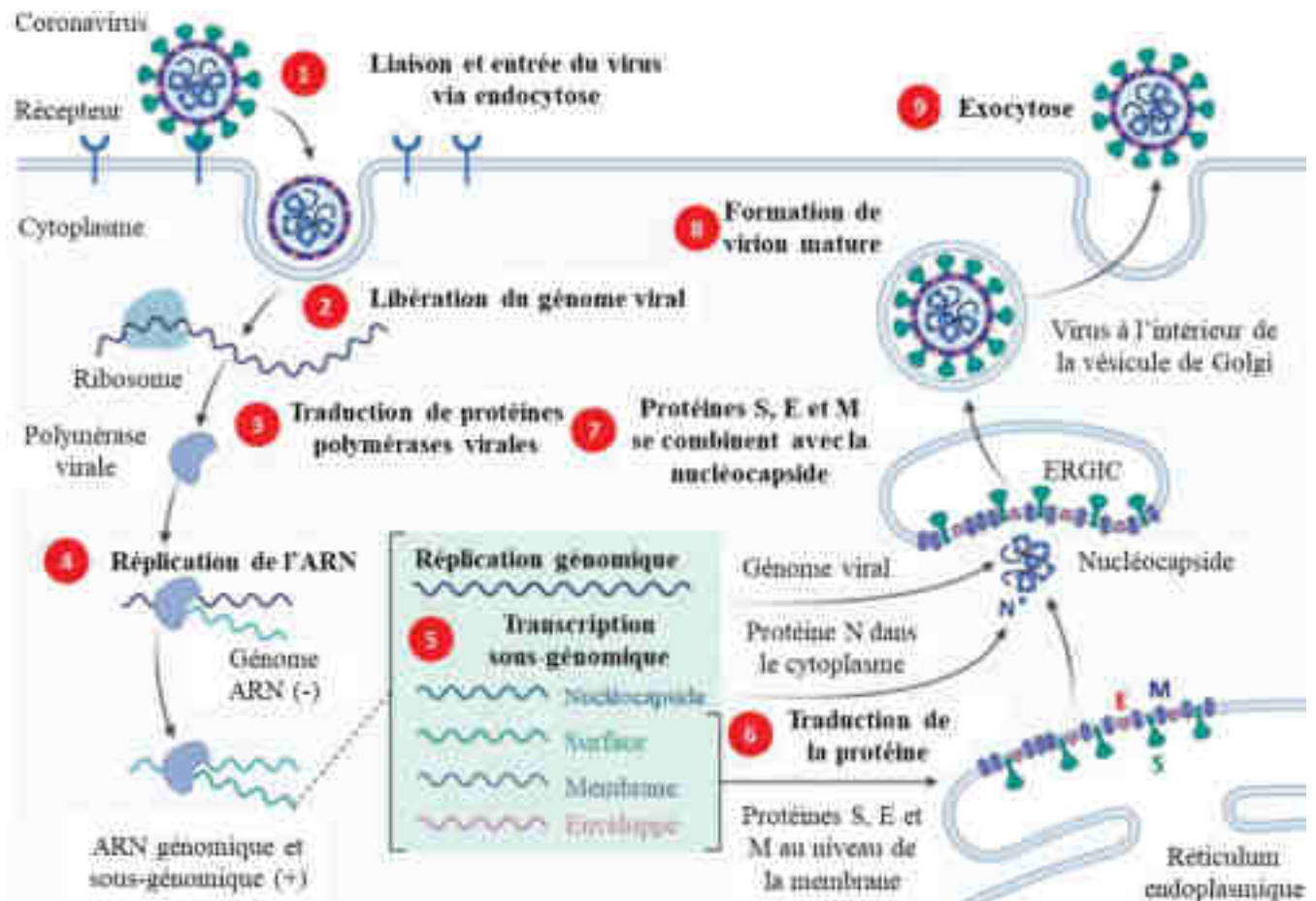


Figure 32 : Cycle de répllication du coronavirus. Développement viral de la liaison du virus, jusqu'à l'exocytose [153].

#### ◆ Transmission, symptômes et diagnostic

Le virus est transmis par **voie aérienne** via des gouttelettes et des sécrétions (toux, crachats, éternuements, ...) ou par **contact direct** avec la bouche, les yeux, le nez et les surfaces contaminées [154, 159, 160, 161]. Il peut par la suite subsister dans l'air dans une pièce non ventilée [161]. Les hommes d'un âge médian de 56 ans, ainsi que les personnes souffrant d'une pathologie chronique telle que l'hypertension, l'obésité ou le diabète sont plus touchés [154, 160]. Cependant, pour les personnes âgées, le taux de létalité est plus élevé (aux alentours de 6,4% contre 1,4% selon une étude réalisée le 30 mars 2020). L'atteinte des enfants est quant à elle moins fréquente et moins grave [160, 161].

Les infections à coronavirus peuvent être **asymptomatiques** ou bien accompagnées de symptômes, différents d'un patient à l'autre, allant d'une maladie bénigne à mortelle [153, 154]. Le Covid-19 provoque une **infection des voies respiratoires inférieures**, les symptômes les plus courants étant de

la fièvre, de la toux, de la fatigue, des expectorations, des douleurs musculaires, une anorexie et des essoufflements [153, 154, 156, 159, 158]. Chez les personnes âgées et immunodéprimées l'infection peut devenir grave allant jusqu'à l'hospitalisation et le décès [156, 159, 161].

Le plus souvent, le virus est détecté à l'aide **d'échantillons nasopharyngés** sur écouvillon, source la plus fiable. La technologie de **réaction par polymérase en chaîne** (PCR) par transcription inverse est le test de référence pour le diagnostic du Covid-19. Il détecte la présence du génome viral, isolant l'ARN et générant de l'ADN complémentaire. L'ADN complémentaire est converti en ADN double brin par amplification PCR. L'amplification de l'échantillon d'ADN est effectuée jusqu'à la détection de l'ADN complémentaire par signal de fluorescence ou électrique [153, 158]. Des **tests antigéniques** plus rapides mais moins fiables peuvent également être réalisés à l'aide d'un échantillon nasal [158, 161]. Les gestes barrières (éloignement physique, port du masque, télétravail, isolement, ...) et le développement d'un vaccin ont été essentiels pour lutter contre le virus [157].

## **b. Vaccins à ARNm contre le Covid-19**

Les **approches vaccinales conventionnelles** (agents pathogènes atténués, inactivés, sous unités protéiques, ...) ont permis d'éradiquer et de limiter l'incidence de certaines maladies telles que la variole, la polio et la rougeole [162, 163, 164]. L'OMS estime que chaque année les vaccins empêchent le décès de 2 à 3 millions de personnes dus à la coqueluche, au tétanos, à la rougeole et à la grippe [165]. Suite à la propagation du Covid-19, la mise en œuvre rapide d'un vaccin était essentielle [163], mais les processus de fabrication des vaccins conventionnels sont complexes, présentent des limites en termes d'évolutivité, de rapidité de développement et d'adaptabilité aux agents pathogènes émergents [164]. Ils se sont donc tournés vers les **vaccins à ARNm** avec leur capacité de développement et de production **rapide**, leur puissance, leur sécurité et leur efficacité élevée [162, 164, 165].

L'**ARNm** est un intermédiaire transitoire entre les gènes et les protéines, découvert dans les années 1960 [163, 166, 167]. A la fin des années 1980, des recherches sur la fonction et la structure des ARNm aboutissent au développement d'**ARNm transcrits in vitro** (IVT). En 1990, une première étude animale réalisée sur des souris entraîne la production de protéines, validant ainsi le principe des vaccins à ARNm. Le processus naturel des thérapies basées sur l'ARNm les rend utilisables pour de nombreuses applications telles que l'immunothérapie anti-cancéreuse, l'édition de génome et les vaccins [166].

De nombreuses stratégies ont ensuite été explorées pour améliorer l'instabilité et l'immunogénicité de l'ARNm IVT [162, 167]. En effet, comme pour les ON, les ARNm ne sont pas des molécules favorables avec un poids moléculaire élevé, une charge négative, une instabilité et une induction d'immunogénicités



[163, 166]. L'ARNm nécessite donc un **système de délivrance** sûr, stable et efficace permettant l'absorption cellulaire, la libération de l'ARNm et protégeant de la dégradation [167]. Les percées dans la vaccination à ARNm ont été réalisées grâce à la formulation des **NPL** qui assurent protection et administration à la cible [166, 168].

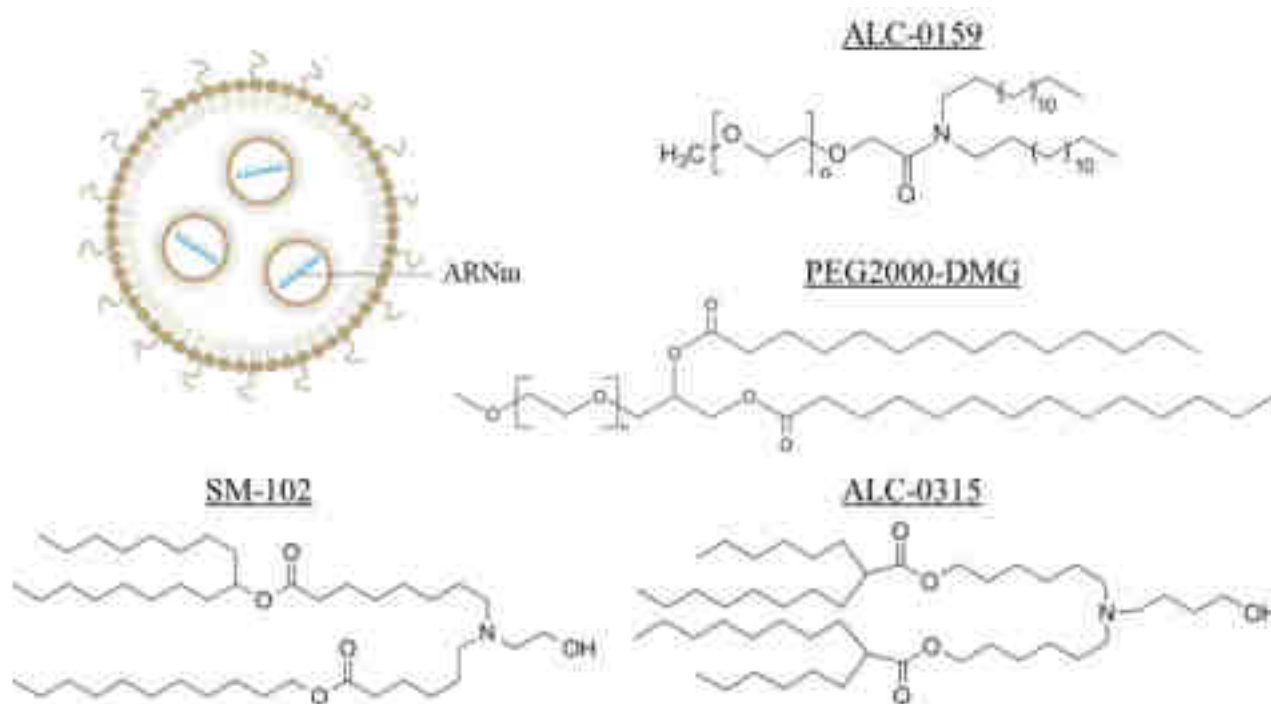
#### ◆ **Modèles des vaccins : NPL et ARNm utilisés**

Trois grandes sociétés d'ARNm, **BioNTech** (Allemagne), **CureVac** (Allemagne) et **Moderna** (Etats-Unis), ont utilisé leurs expertises et infrastructures pour générer un vaccin contre le Covid-19. Le virus étant similaire à celui de 2003, il a été rapidement déterminé que la protéine de pointe permettait de pénétrer les cellules en reconnaissant l'ACE2 [169]. C'est donc une année après le début de la pandémie que deux vaccins à ARNm, l'**ARNm-1273** et le **BNT162b2**, sont approuvés par la FDA et l'EMA pour une utilisation d'urgence [158].

La société **Moderna** est la première à démarrer les essais cliniques avec la première injection du vaccin le 16 mars 2020 [169]. Le vaccin utilise un **ARNm modifié** par la **pseudo-uridine** (modification supprimant la réponse immunitaire innée entraînant alors une augmentation de la production de protéines) codant pour la **protéine S complète** du SARS-CoV-2 stabilisée dans la conformation de **pré-fusion** (améliore l'immunogénicité) et formulé dans des **NPL** (*Figure 33*). Son efficacité est de 94,1%, il est rapidement approuvé par la FDA et l'EMA pour une utilisation d'urgence [157, 158, 169, 170]. Le vaccin est nommé **ARNm-1273**, puis **Spikevax** et utilise le lipide ionisable **SM-102**. Il est injecté par voie intramusculaire (100 µg) et est composé de SM-102 (heptadécane-9-yl 8-((2-hydroxyéthyl)(6-oxo-6-(undécyloxy) hexyl) amino) octanoate), de DSPC, de cholestérol et de PEG2000-DMG dans un rapport molaire de 50/10/38,5/1,5 (*Figure 33*) [166, 171].

Le 23 avril 2020 la première injection du vaccin **Pfizer/BioNTech** a lieu. Tout comme Moderna, ils utilisent un **ARNm modifié** par la **pseudo-uridine** codant pour la **protéine de pointe complète** stabilisée dans la conformation de pré-fusion et encapsulé dans des **NPL** (*Figure 33*). Son efficacité, semblable à celle de Moderna, est de 95 %. C'est le premier médicament à base d'ARNm jamais approuvé et le premier vaccin contre le Covid-19 autorisé : le 11 décembre aux Etats-Unis et le 21 décembre 2020 en France [157, 158, 169, 170]. Le vaccin est nommé **BNT162b2**, puis **Comirnaty** et utilise le lipide ionisable **ALC-0315** [166, 171]. Il est injecté par voie intramusculaire (30 µg) et est composé d'AL-0315 ([4-hydroxybutyl]azanediyl]bis(hexane-6,1-diy]bis(2-hexyldécanoate)), de DSPC, de cholestérol et d'ALC-0159 (2-[(polyéthylène glycol)-2000]-N,N-ditétradécylacétamide) dans un rapport molaire de 46,3/9,4/42,7/1,6 (*Figure 33*) [170].

De nombreuses recherches ont été effectuées pour améliorer les propriétés des lipides ionisables cationiques. SM-102 et ALC-0315, tout comme le DLin-MC3-DMA, contiennent un groupe de tête **amine tertiaire** (Figure 33) avec une ionisation dépendant du pH. Cependant, ils possèdent en plus un **groupe hydroxyle terminal** (Figure 33) permettant la diminution de l'hydratation du groupe de tête et l'amélioration des interactions des liaisons hydrogène avec l'ON, conduisant alors à une meilleure capacité de transfection. Tous les lipides ionisables actuellement commercialisés sont constitués de **linker ester** (Figure 33), linker biodégradable entraînant une clairance rapide in vivo et donc une possibilité de dosage multiple et une réduction des effets indésirables. Les queues des lipides ionisables de SM-102 et d'ALC-0315 diffèrent de celle du DLin-MC3-DMA, ils possèdent en effet deux **queues saturées ramifiées** (Figure 33) leur conférant une géométrie en forme de cône, facilitant ainsi la déstabilisation de la membrane endosomale et la libération de l'ON. Des études ne cessent d'être réalisées dans le but d'obtenir des lipides toujours plus puissants [172].



*Figure 33 : Lipides ionisables et lipides-PEG composant les vaccins à ARNm contre le Covid-19. NPL composée de lipides ionisables : ALC-0315 (Pfizer/BioNTech) et SM-102 (Moderna) ; et de lipides-PEG : ALC-0159 (Pfizer/BioNTech) et PEG2000-DMG (Moderna) [167, 170].*

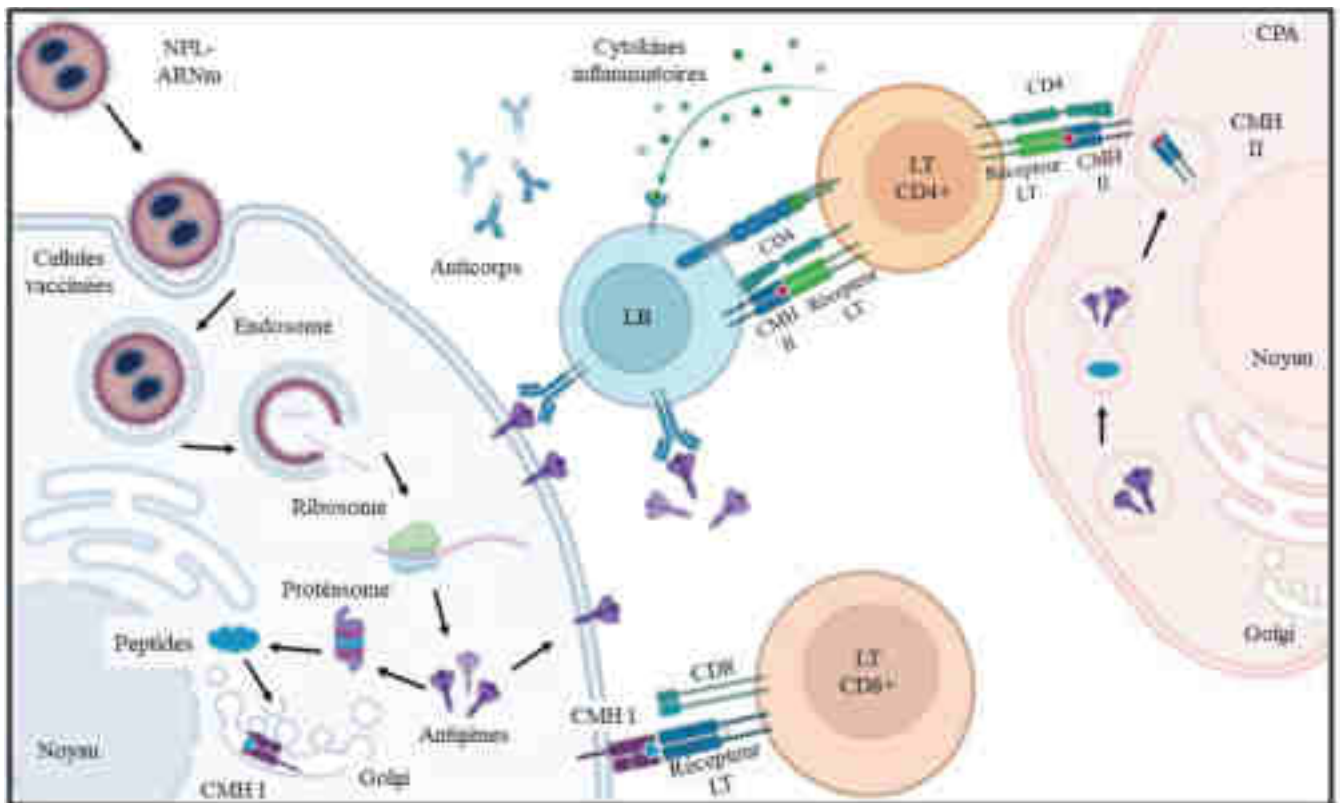
## ◆ Mécanisme d'action

La technologie utilisant les ARNm repose sur le transfert d'un ARNm codant pour un **antigène** ou une **protéine d'intérêt**, permettant la stimulation d'une **réponse immunitaire**. L'ARNm IVT est fabriqué à partir de matrices d'ADN à l'extérieur du corps humain, puis injecté et traduit au sein du cytoplasme [164, 173]. Pour induire un effet, l'ARNm doit atteindre sa cible et produire suffisamment de protéines [167].

Le vaccin est dans un premier temps **injecté** par voie intramusculaire, entraînant l'**endocytose** des NPL au sein de cellules somatiques (musculaires, épidermiques, ...), puis la **libération** de l'ARNm dans le cytoplasme. Cet ARNm peut alors être **traduit** par les ribosomes en protéines antigéniques, protéines dégradées en petits peptides (**épitopes**) par le **protéasome**. Ces peptides sont chargés sur les molécules du **complexe majeur d'histocompatibilité de classe I** (CMH I) et présentés à la surface cellulaire. Ils se lient finalement aux récepteurs des **lymphocytes T (LT) exprimant le cluster de différenciation 8+** (CD8+), provoquant ainsi la destruction des cellules infectées (*Figure 34*).

Les protéines antigéniques produites sont également endocytées par les **cellules présentatrices d'antigènes** (CPA). Une inflammation locale et transitoire est induite par l'administration des vaccins, provoquant le recrutement de CPA au site d'administration. Ces CPA absorbent les NPL, qui sont ensuite dégradées par des lysosomes produisant les épitopes chargés sur les **CMH II** et reconnus par les **LT CD4+**. Des réponses immunitaires avec la **sécrétion de cytokines** inflammatoires et l'activation de **lymphocytes B** (LB) sont alors entraînées (*Figure 34*).

Après la transfection de cellules immunitaires et non immunitaires locales, une partie du vaccin est dirigée vers les **ganglions lymphatiques**. Ces ganglions contiennent des monocytes, des LT et LB naïfs. L'endocytose des NPL par les CPA des ganglions initie l'amorçage et l'activation des LT et LB [164, 165, 167, 168, 170].



*Figure 34 : Mécanisme d'action des vaccins à ARNm. A gauche : NPL endocytées dans les cellules vaccinées → ARNm libéré dans le cytoplasme → ARNm traduit en protéines antigéniques par les ribosomes → Destruction par le protéasome → Chargement des épitopes dans le CMH I et présentation à la surface → Liaison au récepteur des LT CD8+. A droite : Protéines antigéniques endocytées dans les CPA → Dégradées par les lysosomes → Chargement des épitopes dans le CMH II et présentation à la surface → Liaison au récepteur LT CD4+ → Production de cytokines inflammatoires et activation des LB [164].*

#### ◆ Avantages et inconvénients

Les vaccins à ARNm possèdent de nombreux **avantages**, leur bénéfice majeur étant une **rapidité de développement** [167, 170, 171]. Ils sont en effet simples à fabriquer, avec une production rapide, évolutive et rentable. D'autre part, l'ARNm ne s'intègre pas à l'ADN de l'hôte et n'est pas infectieux, conférant au vaccin une **sécurité** accrue [157, 165, 167, 168]. De surcroît, l'ARNm est dégradé naturellement en quelques jours à quelques semaines, supprimant les risques de mutagenèse insertionnelle et de production incontrôlée de protéines [168, 171]. Des modifications de l'ARNm permettent également d'augmenter l'**efficacité** et de rendre le vaccin plus stable. De plus, plusieurs

ARNm codants pour divers antigènes peuvent être combinés renforçant la réponse immunitaire [165, 168].

Cependant, les vaccins à ARNm possèdent également des **inconvenients**, un des plus gros défis étant la faible stabilité des ARNm résolu avec l'encapsulation au sein de NPL [167, 170]. Le problème de **conservation à basses températures** dans des congélateurs est néanmoins toujours d'actualité et entrave la distribution et l'accès aux vaccins [158, 170]. D'autre part, un problème d'**acceptation** du vaccin contre le Covid-19 et des vaccins en général est présent. En effet, une diminution de la couverture et du nombre d'administration vaccinale conduit actuellement à la réémergence de maladies. C'est le cas de la rougeole, éradiquée des Etats-Unis en 2000, touchant plus de 1 200 personnes en 2019 [165, 174]. Les patients doutent de la sécurité (stade précoce de développement, aucun profil de sécurité à long terme, nouvelle technologie), de l'efficacité (peu de rapport d'efficacité, durée de l'immunité courte) et s'inquiètent des effets indésirables des vaccins contre le Covid-19 (anaphylaxie, myocardite), finissant par ne pas se faire vacciner [157, 168, 174, 175].

Une autre problématique est l'émergence de **variants**, causés par des **mutations** faux sens au sein de la protéine S, pouvant augmenter la transmissibilité, la virulence et diminuer l'efficacité des vaccins. Une substitution a lieu environ tous les 11 jours et certaines mutations donnent naissance à de nouveaux variants : Alpha en septembre 2020 au Royaume-Uni (transmissibilité et gravité accrue), Bêta en octobre 2020 en Afrique du Sud (transmissibilité et gravité accrue, réduction possible de l'effet du vaccin), Gamma en janvier 2021 au Brésil (transmissibilité et gravité accrue, réduction possible de l'effet du vaccin), Delta en décembre 2020 en Inde (hautement transmissible, très sévère, réduction de l'effet du vaccin), ... Les mutations altèrent la précision du diagnostic et l'effet des vaccins, qui sont alors régulièrement modifiés pour conserver leur efficacité [157, 158].

## Conclusion

Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été consacrés au développement de systèmes de plus en plus efficaces permettant la délivrance d'ON. Dans ce contexte, les vecteurs non viraux à base de lipides sont apparus comme les systèmes d'administration les plus prometteurs [84]. Surmonter les différentes barrières empêchant les ON d'atteindre leur cible était une des conditions essentielles pour une thérapie à base d'ON réussie [83]. Depuis la première description des liposomes en 1965, nos connaissances sur les lipides et leur rôle dans les membranes se sont considérablement élargies. Cette meilleure compréhension a donné lieu à des innovations et découvertes impactantes [85], telles que l'approbation de l'Onpattro permettant la validation de la technologie des NPL pour l'encapsulation d'ON. L'utilisation des NPL s'est avérée efficace pour la protection de l'ON et son entrée au sein de la cellule cible [80].

L'utilisation des NPL pour l'administration des ON a fait d'énormes progrès au cours de la dernière décennie. L'un des développements clés étant la conception d'amino-lipides ionisables neutres à pH physiologique, remplaçant les lipides cationiques chargés en permanence [93]. Ils nécessitent une conception minutieuse pour optimiser leurs propriétés de complexation et de libération endosomale [95], une petite variation structurelle pouvant entraîner de grandes modifications [93]. Les lipides ionisables sont considérés comme des molécules à plusieurs composants dont chaque partie doit être conçue avec précision afin de conditionner et délivrer l'ON de manière sûre et efficace [172]. Les variations des lipides conduisent ensuite à d'innombrables formulations de NPL. Une compréhension fondamentale des propriétés physicochimiques des différents éléments composant les NPL est donc primordiale [101].

Cependant, les stratégies actuelles manquent encore d'efficacité *in vivo* et de capacité de ciblage. En effet, jusqu'à présent l'opsonisation par ApoE a permis l'acheminement des NPL vers les hépatocytes. Cependant, il est toujours difficile de cibler d'autres tissus et organes que le foie [82, 93]. Des NPL dotées de fonctions de ciblage innovantes sont donc attendues, la modulation de la surface des particules pour attirer d'autres opsonines pourrait améliorer la spécificité de ciblage et aider à atteindre d'autres organes et tissus [93, 100, 166]. De plus, l'organisation interne des NPL n'est pas encore résolue de manière universelle et plusieurs théories se disputent, il est donc essentiel d'améliorer notre compréhension sur les propriétés de ces vecteurs [172]. Le prix des médicaments peut également représenter un inconvénient à long terme, des efforts semblants nécessaires pour aligner les prix afin de garantir un accès durable pour tous les patients [121].

Malgré certains problèmes subsistants, les progrès réalisés à partir des NPL ont permis le développement des vaccins à base d'ARNm à une vitesse sans précédent, démontrant encore une fois le potentiel

clinique des NPL [167]. La flexibilité, l'adaptabilité et la capacité de production rapide des technologies à base de NPL en font des outils précieux pour la prévention des maladies et les interventions thérapeutiques [164]. Mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer tout le potentiel et optimiser leur utilisation dans différentes maladies telles que les maladies virales, dégénératives, métaboliques ou même cancéreuses [88, 100, 164]. Les applications médicales n'en sont qu'à leurs débuts, mais aucunes solutions universelles adaptées à toutes les maladies n'existent, il faut donc continuer les études pour optimiser les NPL et les lipides ionisables utilisés [172]. Un long chemin reste à parcourir pour répondre aux attentes croissantes [84].

## Bibliographie

- [1] Aartsma-Rus A. New Momentum for the Field of Oligonucleotide Therapeutics. *Mol Ther.* Février 2016 ; 24 (2) : 193-194. doi : 10.1038/mt.2016.14.
- [2] Hammond SM, Aartsma-Rus A, Alves S, Borgos SE, Buijsen RAM, Collin RWJ, et al. Delivery of oligonucleotide-based therapeutics : challenges and opportunities. *EMBO Mol Med.* Avril 2021 ; 13 (4) : e13243. doi : 10.15252/emmm.202013243.
- [3] Gökirmak T, Nikan M, Wiechmann S, Prakash TP, Tanowitz M, Seth PP. Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* Juillet 2021 ; 42 (7) : 588-604. doi : 10.1016/j.tips.2021.04.010.
- [4] Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* Octobre 2020 ; 19 (10) : 673-694. doi : 10.1038/s41573-020-0075-7.
- [5] Mangla P, Vicentini Q, Biscans A. Therapeutic Oligonucleotides : An Outlook on Chemical Strategies to Improve Endosomal Trafficking. *Cells.* Septembre 2023 ; 12 (18) : 2253. doi : 10.3390/cells12182253.
- [6] Mathew V, Wang AK. Inotersen : new promise for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis. *Drug Des Devel Ther.* Mai 2019 ; 13 : 1515-1525. doi : 10.2147/DDDT.S162913.
- [7] Wang R, Wang X, Xie S, Zhang Y, Ji D, Zhang X, et al. Molecular éléments : novel approaches for molecular building. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Février 2023 ; 378 (1871) : 20220024. doi : 10.1098/stb.2022.0024.
- [8] Guillaume Blin, « Combinatoire and Bio-informatique : Comparaison de structures d'ARN et calcul de distances intergénomiques », informatique, université de Nantes, 2005.
- [9] Sabine Caussanel, « Contribution à l'étude du rôle de CKIP-1 dans la différenciation musculaire régulée par PI3-K – Identification des ARN messagers correspondants aux formes de la protéines CKIP-1 », Science de la Vie et de la Terre, école pratique des hautes études, 2003.
- [10] Perrin-Schmitt F, « Méthode de biologie moléculaire : diversité et évolution du génome », PACES UE1 TD6, décembre 2016.
- [11] Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Matthew P, et al (trad. Pierre L. Masson et Chrystelle Sanlaville), *Biologie moléculaire de la cellule* [« Molecular Cell Biology »], Bruxelles, De Boeck Université, 2005, 3<sup>e</sup> éd., p 1096.



- [12] Bost JP, Barriga H, Holme MN, Gallud A, Maugeri M, Gupta D, et al. Delivery of Oligonucleotide Therapeutics: Chemical Modifications, Lipid Nanoparticles, and Extracellular Vesicles. *ACS Nano*. Septembre 2021 ; 15 (9) : 13993-14021. doi : 10.1021/acsnano.1c05099.
- [13] Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther*. Mai 2017 ; 25 (5) : 1069-1075. doi : 10.1016/j.ymthe.2017.03.023.
- [14] Scharner J, Aznarez I. Clinical Applications of Single-Stranded Oligonucleotides : Current Landscape of Approved and In-Development Therapeutics. *Mol Ther*. Février 2021 ; 29 (2) : 540-554. doi : 10.1016/j.ymthe.2020.12.022.
- [15] Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol*. Mars 2017 ; 35 (3) : 238-248. doi : 10.1038/nbt.3765.
- [16] Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides : State of the Art. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Janvier 2019 ; 59 : 605-630. doi : 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050.
- [17] Barresi V, Musmeci C, Rinaldi A, Condorelli DF. Transcript-Targeted Therapy Based on RNA Interference and Antisense Oligonucleotides: Current Applications and Novel Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. Août 2022 ; 23 (16) : 8875. doi : 10.3390/ijms23168875.
- [18] Adachi H, Hengesbach M, Yu YT, Morais P. From Antisense RNA to RNA Modification : Therapeutic Potential of RNA-Based Technologies. *Biomedicines*. Mai 2021 ; 9 (5) : 550. doi : 10.3390/biomedicines9050550.
- [19] Aoki Y, Wood MJA. Emerging Oligonucleotide Therapeutics for Rare Neuromuscular Diseases. *J Neuromuscul Dis*. 2021 ; 8 (6) : 869-884. doi : 10.3233/JND-200560.
- [20] Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. Septembre 2015 ; 16 (9) : 543-52. doi : 10.1038/nrg3978.
- [21] Okamoto S, Echigoya Y, Tago A, Segawa T, Sato Y, Ito T. Antiviral Efficacy of RNase H-Dependent Gapmer Antisense Oligonucleotides against Japanese Encephalitis Virus. *Int J Mol Sci*. Octobre 2023 ; 24 (19) : 14846. doi : 10.3390/ijms241914846.
- [22] Parham JS, Goldberg AC. Mipomersen and its use in familial hypercholesterolemia. *Expert Opin Pharmacother*. Février 2019 ; 20 (2) : 127-131. doi : 10.1080/14656566.2018.1550071.
- [23] Kolovou G, Kolovou V, Katsiki N. Volanesorsen : A New Era in the Treatment of Severe Hypertriglyceridemia. *J Clin Med*. Février 2022 ; 11 (4) : 982. doi : 10.3390/jcm11040982.
- [24] Blair HA. Tofersen : First Approval. *Drugs*. Juillet 2023 ; 83 (11) : 1039-1043. doi : 10.1007/s40265-023-01904-6.

- [25] Cerillo JL, Parmar M, « Tofersen », StatPearls Publishing, novembre 2023.
- [26] Meyer T, Schumann P, Weydt P, Petri S, Koc Y, Spittel S, et al. Neurofilament light-chain response during therapy with antisense oligonucleotide tofersen in SOD1-related ALS: Treatment experience in clinical practice. *Muscle Nerve*. Juin 2023 ; 67 (6) : 515-521. doi : 10.1002/mus.27818.
- [27] Alchetron, « Fomivirsen ». Consulté le 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://alchetron.com/cdn/fomivirsen-83443e6b-e592-4431-86b6-bae2ddab6ea-resize-750.jpeg>.
- [28] Rxeconsult, « Kynamro (mipomersen) Prix, effets secondaires, posologie, informations de prescription ». Consulté le 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.rxeconsult.com/healthcare-articles/Kynamro-mipomersen-Price-Side-Effects-Dosing-Prescribing-Information-502/>.
- [29] Libération, « Maladie de Charcot : le Qalsody, nouveau traitement approuvé par le régulateur européen ». Consulté le 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.liberation.fr/resizer/c9e5FSekZljZbzBDPIT8qPUleFg=/768x0/filters:format\(jpg\):quality\(70\):focal\(514x532:524x542\)/cloudfront-eu-central1.images.arcpublishing.com/liberation/WR37ZYFQUVF5HPRTTPSVBBQM2U.jpeg](https://www.liberation.fr/resizer/c9e5FSekZljZbzBDPIT8qPUleFg=/768x0/filters:format(jpg):quality(70):focal(514x532:524x542)/cloudfront-eu-central1.images.arcpublishing.com/liberation/WR37ZYFQUVF5HPRTTPSVBBQM2U.jpeg).
- [30] Sobi, « Tegsedi ». Consulté le 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.sobi.com/sites/default/files/styles/inline\\_image/public/images/tegsedi-packaging.jpg.webp](https://www.sobi.com/sites/default/files/styles/inline_image/public/images/tegsedi-packaging.jpg.webp).
- [31] Sobi, « Waylivra ». Consulté le 10 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.sobi.com/sites/default/files/styles/inline\\_image/public/images/210212\\_Packshot\\_Waylivra\\_front\\_links\\_klein\\_.jpg.webp](https://www.sobi.com/sites/default/files/styles/inline_image/public/images/210212_Packshot_Waylivra_front_links_klein_.jpg.webp).
- [32] Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin KT, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. Janvier 2020 ; 48 (2) : 802-816. doi : 10.1093/nar/gkz1132.
- [33] Zhu A, Chiba S, Shimizu Y, Kunitake K, Okuno Y, Aoki Y, et al. Ensemble-Learning and Feature Selection Techniques for Enhanced Antisense Oligonucleotide Efficacy Prediction in Exon Skipping. *Pharmaceutics*. Juin 2023 ; 15 (7) : 1808. doi : 10.3390/pharmaceutics15071808.
- [34] Kandasamy P, McClorey G, Shimizu M, Kothari N, Alam R, Iwamoto N, et al. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity. *Nucleic Acids Res*. Juin 2022 ; 50 (10) : 5443-5466. doi : 10.1093/nar/gkac018.
- [35] Aartsma-Rus A, van Roon-Mom W, Lauffer M, Siezen C, Duijndam B, Coenen-de Roo T, et al. Development of tailored splice-switching oligonucleotides for progressive brain disorders in Europe:

development, regulation, and implementation considerations. *RNA*. Avril 2023 ; 29 (4) : 446-454. doi : 10.1261/rna.079540.122.

[36] Winkelsas AM, Grunseich C, Harmison GG, Chwalenia K, Rinaldi C, Hammond SM, et al. Targeting the 5' untranslated region of SMN2 as a therapeutic strategy for spinal muscular atrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. Janvier 2021 ; 23 : 731-742. doi : 10.1016/j.omtn.2020.12.027.

[37] Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen : A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther*. Mai-Juin 2019 ; 24 (3) : 194-203. doi : 10.5863/1551-6776-24.3.194.

[38] Inserm, « Myopathie de Duchenne – Quand un défaut de génétique conduit à la destruction de tous les muscles ». Consulté le 12 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.inserm.fr/dossier/myopathie-duchenne/>.

[39] Shirley M. Casimersen : First Approval. *Drugs*. Mai 2021 ; 81 (7) : 875-879. doi : 10.1007/s40265-021-01512-2.

[40] Hill SF, Meisler MH. Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Dev Neurosci*. 2021 ; 43 (3-4) : 247-252. doi : 10.1159/000517686.

[41] Aartsma-Rus A, Garanto A, van Roon-Mom W, McConnell EM, Suslovitch V, Yan WX, et al. Consensus Guidelines for the Design and In Vitro Preclinical Efficacy Testing N-of-1 Exon Skipping Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. Janvier 2023 ; 33 (1) : 17-25. doi : 10.1089/nat.2022.0060.

[42] Everyone.org, « Spinraza (Nusinersen) ». Consulté le 14 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/s/p/spinraza\\_2.jpg](https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/s/p/spinraza_2.jpg).

[43] Everyone.org, « Vyondys 53 (golodirsén) ». Consulté le 14 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/v/y/vyondys\\_53.jpg](https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/v/y/vyondys_53.jpg).

[44] Everyone.org, « Amondys 45 (casimersén) ». Consulté le 14 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/a/m/amondys\\_45\\_img.jpeg](https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/a/m/amondys_45_img.jpeg).

[45] Everyone.org, « Viltepso (viltolarsén) ». Consulté le 14 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/v/i/viltepso\\_img.jpg](https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/v/i/viltepso_img.jpg).

- [46] Ewondys51, « Une thérapie par saut d'exon utilisée pour traiter Duchenne ». Consulté le 14 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.exondys51.com/sites/default/files/2022-05/2-1-packaging\\_0.jpg](https://www.exondys51.com/sites/default/files/2022-05/2-1-packaging_0.jpg).
- [47] Zhu G, Chen X. Aptamer-based targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* Septembre 2018 ; 134 : 65-78. doi : 10.1016/j.addr.2018.08.005.
- [48] Yu AM, Choi YH, Tu MJ. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *Pharmacol Rev.* Octobre 2020 ; 72 (4) : 862-898. doi : 10.1124/pr.120.019554.
- [49] Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA. Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Janvier 2017 ; 57 : 61-79. doi : 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558.
- [50] Allemailem KS, Almatroudi A, Alsahli MA, Basfar GT, Alrumaihi F, Rahmani AH, et al. Recent advances in understanding oligonucleotide aptamers and their applications as therapeutic agents. *3 Biotech.* Décembre 2020 ; 10 (12) : 551. doi : 10.1007/s13205-020-02546-1.
- [51] Byun J. Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers. *Life (Basel).* Février 2021 ; 11 (3) : 193. doi : 10.3390/life11030193.
- [52] Aljohani MM, Cialla-May D, Popp J, Chinnappan R, Al-Kattan K, Zourob M. Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules.* Janvier 2022 ; 27 (2) : 383. doi : 10.3390/molecules27020383.
- [53] MDPI, « Un point culminant des progrès récents de la technologie aptamer et de son application ». Consulté le 15 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.mdpi.com/molecules/molecules-20-11959/article\\_deploy/html/images/molecules-20-11959-g001-550.jpg](https://www.mdpi.com/molecules/molecules-20-11959/article_deploy/html/images/molecules-20-11959-g001-550.jpg).
- [54] Nanotechnology Products Database, « Macugen ». Consulté le 16 octobre 2023. Disponible sur : [https://product.statnano.com/resource/pr\\_brand/files/images/21/2/main\\_c4ca4238a0b923820dcc509a6f75849b656410.jpg](https://product.statnano.com/resource/pr_brand/files/images/21/2/main_c4ca4238a0b923820dcc509a6f75849b656410.jpg)
- [55] Traber GM, Yu AM. RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *J Pharmacol Exp Ther.* Janvier 2023 ; 384 (1) : 133-154. doi : 10.1124/jpet.122.001234.
- [56] Lim SA, Cox A, Tung M, Chung EJ. Clinical progress of nanomedicine-based RNA therapies. *Bioact Mater.* Octobre 2021 ; 12 : 203-213. doi : 10.1016/j.bioactmat.2021.10.018.
- [57] Ioannou A, Fontana M, Gillmore JD. Patisiran for the Treatment of Transthyretin-mediated Amyloidosis with Cardiomyopathy. *Heart Int.* Juin 2023 ; 17 (1) : 27-35. doi : 10.17925/HI.2023.17.1.27.

- [58] Debacker AJ, Voutilainen J, Catley M, Blakey D, Habib N. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug. *Mol Ther*. Août 2020 ; 28 (8) : 1759-1771. doi : 10.1016/j.ymthe.2020.06.015.
- [59] Zhao L, Wang X, Zhang X, Liu X, Ma N, Zhang Y, et al. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable Rare Dis Res*. Novembre 2020 ; 9 (4) : 205-216. doi : 10.5582/irdr.2020.03089.
- [60] Fontanellas A, Ávila MA, Arranz E, Enríquez de Salamanca R, Morales-Conejo M. Acute intermittent porphyria, givosiran, and homocysteine. *J Inher Metab Dis*. Juillet 2021 ; 44 (4) : 790-791. doi : 10.1002/jimd.12411.
- [61] Gang X, Liu F, Mao J. Lumasiran for primary hyperoxaluria type 1: What we have learned? *Front Pediatr*. Janvier 2023 ; 10 : 1052625. doi : 10.3389/fped.2022.1052625.
- [62] D'Ambrosio V, Ferraro PM. Lumasiran in the Management of Patients with Primary Hyperoxaluria Type 1: From Bench to Bedside. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. Juin 2022 ; 15 : 197-206. doi : 10.2147/IJNRD.S293682.
- [63] Lamb YN. Inclisiran : First Approval. *Drugs*. Février 2021 ; 81 (3) : 389-395. doi : 10.1007/s40265-021-01473-6.
- [64] Rogula S, Błażejowska E, Gąsecka A, Szarpak Ł, Jaguszewski MJ, Mazurek T, et al. Inclisiran-Silencing the Cholesterol, Speaking up the Prognosis. *J Clin Med*. Juin 2021 ; 10 (11) : 2467. doi : 10.3390/jcm10112467.
- [65] Keam SJ. Vutrisiran : First Approval. *Drugs*. Septembre 2022 ; 82 (13) : 1419-1425. doi : 10.1007/s40265-022-01765-5.
- [66] Cantone A, Sanguetoli F, Dal Passo B, Serenelli M, Rapezzi C. The treatment of amyloidosis is being refined. *Eur Heart J Suppl*. Novembre 2022 ; 24 (Suppl I) : I131-I138. doi : 10.1093/eurheartjsupp/suac104.
- [67] Clinical Trials Arena, « Onpattro (patisiran) pour le traitement de la polyneuropathie de l'amylose héréditaire médiate par la transthyrétine chez l'adulte ». Consulté le 18 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.clinicaltrialsarena.com/wp-content/uploads/sites/22/2019/07/11-Image-Onpattro.jpg>.
- [68] Everyoneorg.org, « Givlaari (givosiran) ». Consulté le 18 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/2a34eb77126804374f02a711ff91db55/g/i/givlaari.jpg>.

- [69] Everyone.org, « Oxlumio (lumasiran) ». Consulté le 18 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://fr.everyone.org/media/catalog/product/cache/e9a289cf2986fcc23b86b9fbe369b06e/o/x/oxluma.jpg>.
- [70] Clinical Trials Arena, « Amvuttra (vutrisiran) pour le traitement de la polyneuropathie de l'amylose hATTR, Etats-Unis ». Consulté le 18 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.clinicaltrialsarena.com/wp-content/uploads/sites/22/2022/07/Featured-Image\\_AMVUTTRA-vutrisiran-for-Treatment-of-hATTR-Amyloidosis-US-1.jpg](https://www.clinicaltrialsarena.com/wp-content/uploads/sites/22/2022/07/Featured-Image_AMVUTTRA-vutrisiran-for-Treatment-of-hATTR-Amyloidosis-US-1.jpg).
- [71] American infusion centers, « Leqvio ». Consulté le 18 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://c3-preview.prosites.com/283348/wy/images/therapies/Leqvio.jpg>.
- [72] Wahane A, Waghmode A, Kappahn A, Dhuri K, Gupta A, Bahal R. Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy. *Molecules*. Juin 2020 ; 25 (12) : 2866. doi : 10.3390/molecules25122866.
- [73] Hall J. Future directions for medicinal chemistry in the field of oligonucleotide therapeutics. *RNA*. Avril 2023 ; 29 (4) : 423 - 433. doi : 10.1261/rna.079511.122.
- [74] Egli M, Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res*. Avril 2023 ; 51 (6) : 2529-2573. doi : 10.1093/nar/gkad067.
- [75] Cheng X, Lee RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. Avril 2016 ; 99 (Pt A) : 129-137. doi : 10.1016/j.addr.2016.01.022.
- [76] Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes : Advancements and innovation in the manufacturing process. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020 ; 154-155 : 102-122. doi : 10.1016/j.addr.2020.07.002.
- [77] Zu H, Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS J*. Juin 2021 ; 23 (4) : 78. doi : 10.1208/s12248-021-00608-7.
- [78] Butt MH, Zaman M, Ahmad A, Khan R, Mallhi TH, Hasan MM, et al. Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy : A Review. *Genes (Basel)*. Juillet 2022 ; 13 (8) : 1370. doi : 10.3390/genes13081370.
- [79] Schlich M, Palomba R, Costabile G, Mizrahy S, Pannuzzo M, Peer D, et al. Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles. *Bioeng Transl Med*. Mars 2021; 6 (2) : e10213. doi : 10.1002/btm2.10213.

- [80] Aldosari BN, Alfagih IM, Almurshedi AS. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*. Février 2021 ; 13 (2) : 206. doi : 10.3390/pharmaceutics13020206.
- [81] Jubeli E, Goldring WP, Pungente MD. Cationic Lipid-Based Nucleic Acid Vectors. *Methods Mol Biol*. 2016 ; 1445 : 19-32. doi : 10.1007/978-1-4939-3718-9\_2.
- [82] Ewert KK, Scodeller P, Simón-Gracia L, Steffes VM, Wonder EA, Teesalu T, et al. Cationic Liposomes as Vectors for Nucleic Acid and Hydrophobic Drug Therapeutics. *Pharmaceutics*. Août 2021 ; 13(9) : 1365. doi : 10.3390/pharmaceutics13091365.
- [83] Patel P, Ibrahim NM, Cheng K. The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends Pharmacol Sci*. Juin 2021 ; 42 (6) : 448-460. doi : 10.1016/j.tips.2021.03.002.
- [84] Ponti F, Campolungo M, Melchiori C, Bono N, Candiani G. Cationic lipids for gene delivery : many players, one goal. *Chem Phys Lipids*. Mars 2021 ; 235 : 105032. doi : 10.1016/j.chemphyslip.2020.105032.
- [85] Leung AWY, Amador C, Wang LC, Mody UV, Bally MB. What Drives Innovation : The Canadian Touch on Liposomal Therapeutics. *Pharmaceutics*. Mars 2019 ; 11 (3) : 124. doi : 10.3390/pharmaceutics11030124.
- [86] Martial Ledoux, « Principaux constituants des lipides – Structure, classification, et nomenclature chimiques ». *Anses*. 2012, numéro spécial 132 et 133. Consulté le : 9 novembre 2023. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.cerim.org/wp-content/uploads/2012/12/132-133-principaux-constituants.pdf>.
- [87] Gemechis Haile Bobo, « L'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux », sciences pharmaceutiques, université de Picardie Jules Verne, mars 2017.
- [88] Boudaud David, « Interférence ARN : utilisation thérapeutique et vectorisation », sciences pharmaceutiques, université d'Angers, novembre 2018.
- [89] Zhu L, Mahato RI. Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. Octobre 2010 ; 7 (10) : 1209-26. doi : 10.1517/17425247.2010.513969.
- [90] Jeanne Leblond, « Conception, synthèse, et évaluation de systèmes non cationiques de vectorisation de l'ADN », *Chemical Sciences*, chimie ParisTech, 2005.
- [91] Marschall ALJ. Targeting the Inside of Cells with Biologicals: Chemicals as a Delivery Strategy. *BioDrugs*. Novembre 2021 ; 35 (6) : 643-671. doi : 10.1007/s40259-021-00500-y.

- [92] Qadir A, Gao Y, Suryaji P, Tian Y, Lin X, Dang K, et al. Non-Viral Delivery System and Targeted Bone Disease Therapy. *Int J Mol Sci.* Janvier 2019 ; 20 (3) : 565. doi : 10.3390/ijms20030565.
- [93] Evers M, Kulkarni J, Van der Meel R, Cullis P, Vador P, Schiffelers R. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods.* Avril 2018 ; 2 (9) : 1700375. doi : 10.1002/smt.201700375.
- [94] Sun D, Lu ZR. Structure and Function of Cationic and Ionizable Lipids for Nucleic Acid Delivery. *Pharm Res.* Janvier 2023 ; 40 (1) : 27-46. doi : 10.1007/s11095-022-03460-2.
- [95] Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceut Med.* Février 2022 ; 36 (1) : 11-20. doi : 10.1007/s40290-021-00417-5.
- [96] Nadia Skandarani, « Développement de nanocapsules lipidiques pour la délivrance de principes actifs », *Micro et nanotechnologies/Microélectronique*, université de Franche-Comté, 2014.
- [97] Semple SC, Leone R, Barbosa CJ, Tam YK, Lin PJC. Lipid Nanoparticle Delivery Systems to Enable mRNA-Based Therapeutics. *Pharmaceutics.* Février 2022 ; 14 (2) : 398. doi : 10.3390/pharmaceutics14020398.
- [98] Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 ; 154-155 : 37-63. doi : 10.1016/j.addr.2020.06.002.
- [99] Mashima R, Takada S. Lipid Nanoparticles: A Novel Gene Delivery Technique for Clinical Application. *Curr Issues Mol Biol.* Octobre 2022 ; 44 (10) : 5013-5027. doi : 10.3390/cimb44100341.
- [100] Yonezawa S, Koide H, Asai T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 ; 154-155 : 64-78. doi : 10.1016/j.addr.2020.07.022.
- [101] Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* Septembre 2022 ; 188 : 114416. doi : 10.1016/j.addr.2022.114416.
- [102] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* Février 2021; 20 (2) : 101-124. doi : 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [103] Mainini F, Eccles MR. Lipid and Polymer-Based Nanoparticle siRNA Delivery Systems for Cancer Therapy. *Molecules.* Juin 2020 ; 25 (11) : 2692. doi : 10.3390/molecules25112692.
- [104] Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal Formulations in Clinical Use : An Updated Review. *Pharmaceutics.* Mars 2017 ; 9 (2) : 12. doi : 10.3390/pharmaceutics9020012.



- [105] Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano*. Novembre 2021 ; 15 (11) : 16982-17015. doi : 10.1021/acsnano.1c04996.
- [106] Fan S, Han H, Yan Z, Lu Y, He B, Zhang Q. Lipid-based nanoparticles for cancer immunotherapy. *Med Rev*. Août 2023 ; 3 (3) : 230-269. doi : 10.1515/mr-2023-0020.
- [107] Zhang Y, Sun C, Wang C, Jankovic KE, Dong Y. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *Chem Rev*. Octobre 2021 ; 121 (20) : 12181-12277. doi : 10.1021/acs.chemrev.1c00244.
- [108] Barba AA, Bochicchio S, Dalmoro A, Lamberti G. Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications. *Pharmaceutics*. Juillet 2019 ; 11 (8) : 360. doi : 10.3390/pharmaceutics11080360.
- [109] Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther*. Juin 2018 ; 28 (3) : 146-157. doi : 10.1089/nat.2018.0721.
- [110] Cullis PR, Hope MJ. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther*. Juillet 2017 ; 25 (7) : 1467-1475. doi : 10.1016/j.ymthe.2017.03.013.
- [111] Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. Mai 2022 ; 8 (5) : e09394. doi : 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
- [112] Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016 ; 44 (1) : 381-91. doi : 10.3109/21691401.2014.953633.
- [113] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*. Décembre 2015 ; 6 : 286. doi : 10.3389/fphar.2015.00286.
- [114] Xia Y, Tian J, Chen X. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery. *Biomaterials*. Février 2016 ; 79 : 56-68. doi : 10.1016/j.biomaterials.2015.11.056.
- [115] Mollé LM, Smyth CH, Yuen D, Johnston APR. Nanoparticles for vaccine and gene therapy : Overcoming the barriers to nucleic acid delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. Novembre 2022 ; 14 (6) : e1809. doi : 10.1002/wnan.1809.

- [116] Jaradat E, Weaver E, Meziane A, Lamprou DA. Microfluidics Technology for the Design and Formulation of Nanomedicines. *Nanomaterials* (Basel). Décembre 2021 ; 11 (12) : 3440. doi : 10.3390/nano11123440.
- [117] Jung HN, Lee SY, Lee S, Youn H, Im HJ. Lipid nanoparticles for delivery of RNA therapeutics : Current status and the role of in vivo imaging. *Theranostics*. Octobre 2022 ; 12 (17) : 7509-7531. doi : 10.7150/thno.77259.
- [118] Maeki M, Uno S, Niwa A, Okada Y, Tokeshi M. Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. *J Control Release*. Avril 202 ; 344 : 80-96. doi : 10.1016/j.jconrel.2022.02.017.
- [119] HAS, « Commission de la transparence – Avis du 20 mars 2019 – Patisiran ». Consulté le 15 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-17388\\_ONPATTRO\\_PIC\\_INS\\_Avis3\\_CT17388.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-17388_ONPATTRO_PIC_INS_Avis3_CT17388.pdf).
- [120] Alnylam, « Amylose héréditaire à transthyréline ». Consulté le 15 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.alnylam.fr/amylose#:~:text=L'amylose%20ATTR%20h%C3%A9r%C3%A9ditaire%20\(hATTR,gastro%2Dintestinal%20\(GI\)\)](https://www.alnylam.fr/amylose#:~:text=L'amylose%20ATTR%20h%C3%A9r%C3%A9ditaire%20(hATTR,gastro%2Dintestinal%20(GI))).
- [121] Mickle K, Lasser KE, Hoch JS, Cipriano LE, Dreitlein WB, Pearson SD. The Effectiveness and Value of Patisiran and Inotersen for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *J Manag Care Spec Pharm*. Janvier 2019 ; 25 (1) : 10-15. doi : 10.18553/jmcp.2019.25.1.010.
- [122] Yu AM, Tu MJ. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacol Ther*. Février 2022 ; 230 : 107967. doi : 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
- [123] Association Française Contre l’Amylose, « Amylose héréditaire à transthyréline – Polyneuropathie ». Consulté le 15 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : <https://amylose.asso.fr/amyloses/amylose-ttr/lamylose-hereditaire-a-transthyretine/polyneuropathie-amyloide-hereditaire-hattr-pn/>.
- [124] Urits I, Swanson D, Swett MC, Patel A, Berardino K, Amgalan A, et al. A Review of Patisiran (ONPATTRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol Ther*. Décembre 2020 ; 9 (2) : 301-315. doi : 10.1007/s40120-020-00208-1.
- [125] Rizk M, Tüzmen Ş. Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. *Pharmgenomics Pers Med*. Novembre 2017 ; 10 : 267-278. doi : 10.2147/PGPM.S87945.
- [126] Carroll A, Dyck PJ, de Carvalho M, Kennerson M, Reilly MM, Kiernan MC, et al. Novel approaches to diagnosis and management of hereditary transthyretin amyloidosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Juin 2022 ; 93 (6) : 668-678. doi : 10.1136/jnnp-2021-327909.

- [127] Dixon S, Kang X, Quan D. Practical Guidance for the Use of Patisiran in the Management of Polyneuropathy in Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Ther Clin Risk Manag*. Novembre 2023 ; 19 : 973-981. doi : 10.2147/TCRM.S361706.
- [128] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. Juillet 2018 ; 379 (1) : 11-21. doi : 10.1056/NEJMoa1716153.
- [129] Ioannou A, Fontana M, Gillmore JD. RNA Targeting and Gene Editing Strategies for Transthyretin Amyloidosis. *BioDrugs*. Mars 2023 ; 37 (2) : 127-142. doi : 10.1007/s40259-023-00577-7.
- [130] Dohrn MF, Ihné S, Hegenbart U, Médine J, Züchner SL, Coelho T, et al. Targeting transthyretin – Mechanism-based treatment approaches and future perspectives in hereditary amyloidosis. *J Neurochem*. Mars 2021 ; vol 156 (6) : 802-818. doi : 10.1111/jnc.15233.
- [131] Cristóbal Gutiérrez H, Pelayo-Negro AL, Gómez Gómez D, Martín Vega MÁ, Valero Domínguez M. Overview of treatments used in transthyretin-related hereditary amyloidosis: a systematic review. *Eur J Hosp Pharm*. Juillet 2020 ; 27 (4) : 194-201. doi : 10.1136/ejhpharm-2018-001823.
- [132] Luigetti M, Guglielmino V, Romano A, Sciarrone MA, Vitali F, D'Ambrosio V, et al. Trajectories of Kidney Function in Patients with ATTRv Treated with Gene Silencers. *Genes (Basel)*. Novembre 2022 ; 13 (12) : 2236. doi : 10.3390/genes13122236.
- [133] Russo M, Gentile L, Di Stefano V, Di Bella G, Minutoli F, Toscano A, et al. Use of Drugs for ATTRv Amyloidosis in the Real World: How Therapy Is Changing Survival in a Non-Endemic Area. *Brain Sci*. Avril 2021 ; 11 (5) : 545. doi : 10.3390/brainsci11050545.
- [134] Zhang X, Goel V, Robbie GJ. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *J Clin Pharmacol*. Mai 2020 ; 60 (5) : 573-585. doi : 10.1002/jcph.1553.
- [135] Matsushima M, Tarisawa M, Nomura T, Oshima Y, Yoshino M, Shibata Y, et al. Practice of Hereditary ATTR Amyloidosis in Non-endemic Areas of Japan. *Intern Med*. Juin 2023 ; 62 (11) : 1599-1602. doi : 10.2169/internalmedicine.0091-22.
- [136] Kristen AV, Ajroud-Driss S, Conceição I, Gorevic P, Kyriakides T, Obici L. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag*. Février 2019 ; 9 (1) : 5-23. doi : 10.2217/nmt-2018-0033.
- [137] Koike H, Katsuno M. Ultrastructure in Transthyretin Amyloidosis: From Pathophysiology to Therapeutic Insights. *Biomedicines*. Février 2019 ; 7 (1) : 11. doi : 10.3390/biomedicines7010011.

- [138] Koike H, Katsuno M. The Ultrastructure of Tissue Damage by Amyloid Fibrils. *Molecules*. Juillet 2021 ; 26 (15) : 4611. doi : 10.3390/molecules26154611.
- [139] Gertz MA, Mauermann ML, Grogan M, Coelho T. Advances in the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis: A review. *Brain Behav*. Septembre 2019 ; 9 (9) : e01371. doi : 10.1002/brb3.1371.
- [140] Lin H, Merkel M, Hale C, Marantz J. Experience of Patisiran With Transthyretin Stabilizers in Patients With Hereditary transthyretin-mediated Amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management*. Avril 2020 ; vol 10 (5) : 289-300. doi : 10.2217/nmt-2020-0020.
- [141] Eicher JC, Audia S, Damy T. L'amylose cardiaque à transthyréline. *Rev Med Interne*. Octobre 2020 ; vol 41 (10) : p 673-683. doi : 10.1016/j.revmed.2020.07.002.
- [142] Padda IS, Mahtani AU, Patel P, Parmar M, « Small Interfering RNA (siRNA) Therapy », StatPearls Publishing, janvier 2024.
- [143] Kalola UK, Pellegrini MV, « Patisiran », StatPearls Publishing, janvier 2024.
- [144] Gangopadhyay S, Gore KR. Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications. *RNA Biol*. Janvier 2022 ; 19 (1) : 452-467. doi : 10.1080/15476286.2022.2052641.
- [145] Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*. Juin 2020 ; 5 (1) : 101. doi : 10.1038/s41392-020-0207-x.
- [146] Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. Décembre 2021 ; 41 : 100424. doi : 10.1016/j.dmpk.2021.100424.
- [147] Thi TTH, Suys EJA, Lee JS, Nguyen DH, Park KD, Truong NP. Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines. *Avril 2021 ; 9(4) : 359*. doi : 10.3390/vaccines9040359.
- [148] MedChemExpress, « PEG ». Consulté le 24 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : [https://file.medchemexpress.com/product\\_pic/hy-145411.gif](https://file.medchemexpress.com/product_pic/hy-145411.gif).
- [149] Polysciences, « Dlin-MC3-DMA structure ». Consulté le 24 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.polysciences.com/media/catalog/product/cache/c44c46ddedcd391a2ef31315a65fb4d0/1/4/14496\\_dlin-mc3-dma\\_structure.png](https://www.polysciences.com/media/catalog/product/cache/c44c46ddedcd391a2ef31315a65fb4d0/1/4/14496_dlin-mc3-dma_structure.png)

- [150] Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. Août 2013 ; 369 (9) : 819 – 829. doi : 10.1056/NEJMoa1208760.
- [151] Gentile L, Russo M, Luigetti M, Bisogni G, Di Paolantonio A, Romano A, et al. Patisiran in hATTR Amyloidosis: Six-Month Latency Period before Efficacy. *Brain Sci*. Avril 2021 ; 11 (4) : 515. doi : 10.3390/brainsci11040515.
- [152] HAS, « AMVUTTRA (vutrisiran) – Amylose héréditaire à transthyrétine ». Consulté le 24 février 2024. [En ligne]. Disponible sur : [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3402366/fr/amvuttra-vutrisiran-amylose-hereditaire-a-transthyretine](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3402366/fr/amvuttra-vutrisiran-amylose-hereditaire-a-transthyretine).
- [153] Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J*. Janvier 2021 ; 23 (1) : 14. doi : 10.1208/s12248-020-00532-2.
- [154] Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J*. Décembre 2020 ; 96 (1142) : 753-758. doi : 10.1136/postgradmedj-2020-138234.
- [155] Mohamed K, Rzymiski P, Islam MS, Makuku R, Mushtaq A, Khan A, et al. COVID-19 vaccinations: The unknowns, challenges, and hopes. *J Med Virol*. Avril 2022 ; 94 (4) : 1336-1349. doi : 10.1002/jmv.27487.
- [156] Gao Z, Xu Y, Sun C, Wang X, Guo Y, Qiu S, et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect*. Février 2021 ; 54 (1) : 12-16. doi : 10.1016/j.jmii.2020.05.001.
- [157] Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Rev Med Virol*. Juillet 2022 ; 32 (4) : e2313. doi : 10.1002/rmv.2313.
- [158] Fernandes Q, Inchakalody VP, Merhi M, Mestiri S, Taib N, Moustafa Abo El-Ella D, et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann Med*. Décembre 2022 ; 54 (1) : 524-540. doi : 10.1080/07853890.2022.2031274.
- [159] Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*. Janvier 2021 ; 13 (2) : 202. doi : 10.3390/v13020202.
- [160] Jamaï Amir I, Lebar Z, yahyaoui G, Mahmoud M. Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique. *Option/Bio*. Juillet – Août 2020 ; 31 (619) : 15–20. doi : 10.1016/S0992-5945(20)30178-1.

- [161] Institut Pasteur, « Covid-19 (virus SARS-COV-2) ». Consulté le 17 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/covid-19-virus-sars-cov-2>.
- [162] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. Avril 2018 ; 17 (4) : 261-279. doi : 10.1038/nrd.2017.243.
- [163] Zhang L, More KR, Ojha A, Jackson CB, Quinlan BD, Li H, et al. Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability. *NPJ Vaccines*. Octobre 2023 ; 8 (1) : 156. doi : 10.1038/s41541-023-00751-6.
- [164] Al Fayed N, Nassar MS, Alshehri AA, Alnefaie MK, Almughem FA, Alshehri BY, et al. Recent Advancement in mRNA Vaccine Development and Applications. *Pharmaceutics*. Juillet 2023 ; 15 (7) : 1972. doi : 10.3390/pharmaceutics15071972.
- [165] Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, et al. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *Int J Mol Sci*. Janvier 2023 ; 24 (3) : 2700. doi : 10.3390/ijms24032700.
- [166] Wang C, Zhang Y, Dong Y. Lipid Nanoparticle-mRNA Formulations for Therapeutic Applications. *Acc Chem Res*. Décembre 2021 ; 54 (23) : 4283-4293. doi : 10.1021/acs.accounts.1c00550.
- [167] Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater*. Août 2021 ; 6 : 1078 – 1094. doi : 10.1038/s41578-021-00358-0.
- [168] Pilkington EH, Suys EJA, Trevaskis NL, Wheatley AK, Zukancic D, Algarni A, et al. From influenza to COVID-19 : Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta Biomater*. Septembre 2021 ; 131 : 16-40. doi : 10.1016/j.actbio.2021.06.023.
- [169] Pascolo S. Synthetic Messenger RNA-Based Vaccines: from Scorn to Hype. *Viruses*. Février 2021 ; 13 (2) : 270. doi : 10.3390/v13020270.
- [170] Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*. Mai 2021 ; 601 : 120586. doi : 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.
- [171] Zeng C, Zhang C, Walker PG, Dong Y. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2022 ; 440 : 71-110. doi : 10.1007/82\_2020\_217.
- [172] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, Sahay G. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc Chem Res*. Janvier 2022 ; 55 : 2 – 12. doi : 10.1021/acs.accounts.1c00544.

[173] Youssef M, Hitti C, Puppin Chaves Fulber J, Kamen AA. Enabling mRNA Therapeutics: Current Landscape and Challenges in Manufacturing. *Biomolecules*. Octobre 2023 ; 13 (10) : 1497. doi : 10.3390/biom13101497.

[174] Parimi K, Gilkeson K, Creamer BA. COVID-19 vaccine hesitancy: Considerations for reluctance and improving vaccine uptake. *Hum Vaccin Immunother*. Novembre 2022 ; 18 (5) : 2062972. doi : 10.1080/21645515.2022.2062972.

[175] Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern : a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. Février 2022 ; 28 (2) : 202-221. doi : 10.1016/j.cmi.2021.10.005.



## FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : Dirand ..... Prénom : Alicia .....

Née le 18 février 1998 ..... à Saint-Avold .....

### TITRE DE LA THESE :

Les lipides cationiques dans la vectorisation d'oligonucléotides .....

Date et lieu de la soutenance : 6 novembre 2024 à Illkirch-Graffenstaden .....

N° d'ordre : .....

### RESUME :

Les oligonucléotides, petits fragments d'acides nucléiques, émergent en tant que nouvelle classe de produits thérapeutiques. Néanmoins, des limites telles que leur dégradation par les nucléases, empêchent leur succès en clinique. Des modifications chimiques, ainsi que leur encapsulation au sein de vecteurs ont conduit à leur commercialisation. Les vecteurs lipidiques tels que les liposomes, les lipoplexes et les nanoparticules lipidiques modernes, ont alors vu le jour. L'utilisation des lipides ionisables cationiques, capables de modifier leur charge en fonction du pH, a permis une diminution de la toxicité, une amélioration de la demi-vie de circulation et l'atteinte de la cible. L'approbation de l'Onpattro valide ainsi la technologie des nanoparticules lipidiques pour l'encapsulation d'oligonucléotides. Ces progrès ont également entraînés le développement des vaccins à base d'ARNm contre le Covid-19, utilisant eux aussi des nanoparticules lipidiques.

### MOTS-CLES :

| Oligonucléotides | Lipides cationiques | Nanoparticules | Vaccins ARNm | siARN |

| Onpattro (patisiran) |

Nom du Directeur de Thèse : Madame Spanedda Maria-Vittoria