

Liste de figures

FIGURE 1: Méthodologie générale	27
FIGURE 2: Séparation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par gradient de Ficoll (241)	29
FIGURE 3: Analyseur de cellules BD LSR Fortessa™ (242).....	34
FIGURE 4: stratégie de gating	31
FIGURE 5: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au MPL.....	37
FIGURE 6: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au CPG	38
FIGURE 7: production de TNF- α - par les monocytes en réponse au R848	39
FIGURE 8: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au QilA	40

LISTE DES ABBREVIATIONS

Abréviations

ADN dB	: ADN double brin
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
APC	: Antigen-Presenting Cell
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNsb	: ARN simple brin
AS01	: for Adjuvant System 01
AS03	: for Adjuvant System 03
AS04	: for Adjuvant System 04
ASC	: Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
BCG	: Bacille de Calmette et Guérin
BCL6	: B-cell Lymphoma 6 protein
CCR	: C-C Chemokine Receptor
CD	: Classe de différenciation
CGAS	: Cyclic GMP-AMP Synthase
CLR	: C type-Lectin Receptors
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	: Cytomégalovirus
CPG-OND	: CpG oligodesoxynucleotides
CSF	: Colony-Stimulating Factors
CTL	: Cytotoxic T lymphocyte
CXCL	: C-X-C motif chemokine

CXCR	: C-X-C chemokine receptor
DAMPs	: Damage-associated molecular patterns
DAP	: Diaminopimelic Acid
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
EDTA	: Ethylenediamine Tetra acetic Acid
ELISA	: Enzyme Linked Immune Sorbent Assay
FACS	: Fluorescence Active Cell Sorter
FBS	: Foetal Bovis Serum
Fc	: Fragment cristallisable
FDA	: Food and Drug Administration
FDC	: Follicular Dendritic Cells
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FSC	: Forward Scatter
GC	: Germinal Center
GLA	: Glucopyranosyl Lipid Adjuvant
GLA-AF	: Aqueous Formulation of Glucopyranosyl Lipid Adjuvant
GSK	: GlaxoSmithKline
Hib	: Haemophilus influenzae invasif de type b
HLA-DR	: Human Leukocyte Antigen – DR isotype
HSV	: Herpes simplex virus
ICOS	: Inducible T-cell Costimulator
ICS	: Intracellular Cytokines Coloration
IFN	: Interferon

IFN-γ	: Interferon-gamma
Ig	: Immunoglobuline
IKKϵ	: Inhibitor- κ B kinase ϵ
IL	: Interleukine
IRF	: Interferon Regulatory Factor
ISCOM	: Immunostimulating Complex
ISS	: Immunostimulatory Sequence
LDH	: Lactate Dehydrogenase
LPS	: Lipopolysaccharide
LRR	: Leucine-rich repeat
MDA5	: Melanoma Differentiation Associated-protein 5
MDP	: Muramyl dipeptide
MF59	: Oil-in-water emulsion of squalene
MPER	: Membrane Proximal External Region
MPLA	: Monophosphoryl Lipid A
MYD88	: Myeloid Differentiation factor 88
NF-κB	: Nuclear Factor-kappa B
NGS	: Next-Generation Sequencing
NK	: Natural Killer
NLR	: NOD-like receptors
NLRP3	: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NOD	: Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins

OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PB	: “Plasmablast”
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	: Program-cell Death 1
pDC	: Plasmacytoid dendritic cells
PEV	: Programme Elargi de Vaccination
PGA	: Polyglycolic Acid
PHB	: Poly Hydroxybutyrate
PKR	: Protein Kinase Receptor
PLA	: Polylactic Acid
PLGA	: Poly Lactic-co-Glycolic Acid
PMT	: Photomultiplier Tubes
PRR	: Pattern Recognition Receptor
QS-21	: purified plant extract derived from (<i>Quillaja Saponaria</i>)
RIG-I	: Retinoic Acid-inducible Gene I
ROR	: vaccin Rougeole-Oreillons-Rubéole
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RSV	: Virus Respiratoire Syncytial
SMIP	: Small Molecule Immune Potentiators
SSC	: Side Scatter
STING	: Stimulator of Interferon Genes
T $\gamma\delta$: Lymphocytes T gamma delta

TB	: Tuberculose
TBK1	: TANK-binding kinase 1
TCR	: T Cell Receptor
Tfh	: T-follicular helper cells
Th	: T helper
Tim-3	: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	: Toll-like Receptor
TRAF	: Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor
TRIF	: Toll/IL-1R domain-containing adapter-inducing interferon- β
UV	: Ultraviolet
VHB	: Virus de l'hépatite B
VHC	: Virus de l'hépatite C
VIH	: Virus d'Immunodéficience Humaine
VLP	: Virus-like particle
VPH	: Virus du Papillome Humain
VTI	: Vaccin Antigrippal Inactivé

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS	3
BIBLIOGRAPHIQUES	3
Chapitre I :	2
Généralités sur les vaccins.....	2
1.1. Généralités	2
1.2. Historique	2
1.3. Définition et principes de la vaccination	3
1.4. Les différents types de vaccins	3
1.4.1. Les vaccins vivants atténués	3
1.4.2. Les vaccins inactivés.....	5
1.4.3. Les vaccins sous-unitaires.....	5
Chapitre 2 :	2
Généralité sur les adjuvants.....	2
2.1. Généralités	7
2.2. Les systèmes de livraison	7
2.2.1. Les sels d'aluminium	8
2.2.2. Les émulsions.....	9
2.2.3. Les liposomes.....	11
2.2.4. Les pseudo particules virales	12
2.2.5. Les anticorps	14
2.3. Les immunomodulateurs	16
2.3.1 Les ligands de PRR.....	16
2.4. La combinaison des adjuvants	19

Chapitre 3 :	22
Immunité et environnement.....	22
3.1. Réponse immunitaire et facteurs environnementaux.....	23
2.2. Hypothèse hygiénique	25
2.3 Environnement et réponse vaccinale	27
DEUXIEME PARTIE :TRAVAIL PERSONNEL	7
Chapitre 1 :	18
Matériel et méthode.....	18
1.1 Objectif de l'étude	27
1.2. Méthodologie.....	27
1.2.1. Séparation cellulaire.....	27
1.2.1.1. Matériel, réactifs et consommable	28
1.2.1.2. Principe de la séparation cellulaire	29
1.2.1.3. Mode opératoire	30
1.2.2. Conservation des cellules mononucléées du sang périphérique	31
1.2.3. Décongélation des PBMC.....	31
1.2.3.1. Matériel et consommables	31
1.2.3.2. Réactifs et adjuvants	32
1.2.3.3. Mode opératoire	32
1.2.4. Stimulation cellulaire	32
1.2.4.1. Adjuvants	32
1.2.4.2. Mode opératoire	33
1.2.5. Analyse par la cytométrie en flux	33
1.2.5.1. Principe	33
1.2.5.2. Mode opératoire	35
1.2.6. Stratégie de gating.....	31
2.2. Réponses des monocytes au MPL	37

2.3. Réponses des monocytes au CPG.....	38
2.4. Réponses des monocytes au R848.....	39
2.5. Réponses des monocytes au QiLA	40
Chapitre 3 : Discussion	36
Discussion.....	41
Conclusion	43
Références.....	44

RESUME

Résumé

Introduction : Les adjuvants sont des constituants importants pour tout vaccin et leurs actions sur le système immunitaire innée restent essentielles pour une réponse vaccinale optimale. Une des objectifs de notre étude sur la différence géographique de la réponse immunitaire consiste à évaluer la réponse cellulaire en réponse aux adjuvants les plus couramment utilisés dans les vaccins existants ou ceux en cours d'essai, chez des sujets vivants dans des zones géographiques différentes. Dans ce cadre, nous nous proposons de déterminer la concentration optimale des différents adjuvants à utiliser ainsi que le temps optimal de stimulation.

Méthodologie : Les cellules mononucléées du sang périphérique ont été isolées par gradient de Ficoll, cryopréservées et plus tard stimulées pendant 24 et 48h avec différentes concentrations d'adjuvants suivants (Life Invivogene): MPL, agoniste du TLR4, aux concentrations de 0,5, 2 and 10µg/ml ; CPG, agoniste du TLR9, à 1, 2,5 et 5µg/ml ; R848, agoniste du TLR7/8, à 0,5, 2 et 5µg/ml et QilA, dérivé de la Saponine, à 1, 5 et 10µg/ml. Les réponses cytokiniques des cellules de l'immunité innée et des lymphocytes B ont ensuite été évaluées par cytométrie en flux utilisant le LSR Fortessa (Becton Dickinson).

Résultats : L'analyse de la réponse des monocytes, cellules dendritiques, les lymphocytes B ainsi que les cellules T $\gamma\delta$ a montré une meilleure réponse cellulaire aux différents adjuvants après 24h de stimulation. En termes de concentration optimale, nous avons trouvé que MPL à 0,5 µg/ml, CPG à 2,5µg/ml, R848 à 2µg/ml, QilA à 5µg/ml produisent une réponse cellulaire optimale. Cependant, la stimulation par MF59 ne produisait pas de réponse cellulaire consécutive.

Conclusion : MPL, CPG, R848 et QilA peuvent être utilisés dans l'étude in-vitro des réponses cellulaires après stimulation de 24h. Ces résultats constituent un aspect important dans la perspective d'évaluation de la différence géographique de la réponse immunitaire aux composant vaccinaux.

Mots clés : Adjuvants, vaccin, différence géographique

INTRODUCTION

Introduction

Le système immunitaire, essentiel pour l'efficacité vaccinale, est façonné non seulement par les prédispositions génétiques mais aussi par les expositions à l'environnement (1). En effet, il existe une différence considérable de l'exposition environnementale selon que l'on vit dans une zone rurale, urbaine ou semi-urbaine d'un pays en développement ou dans un pays développé (2). Dans les pays en développement, en particulier dans les zones rurales, les conditions environnementales rudes telles que l'exposition à de multiples microorganismes ainsi que l'état nutritionnel sous-optimal influent sur le système immunitaire (3;4) . L'une des preuves les plus évidentes de l'impact géographique sur le système immunitaire est la disparité de la réponse immunitaire et de l'efficacité contre certains vaccins en vigueur (5;6). Dans le but d'évaluer la différence géographique de la réponse immunitaire au vaccin, nous nous proposons d'abord d'évaluer la réponse cellulaire aux adjuvants les plus couramment utilisés chez des sujets vivants dans des zones géographiques différentes. En effet en dehors de l'antigène vaccinal, la plupart des vaccins contiennent des adjuvant qui ont pour rôle de potentialiser la réponse immunitaire. Les adjuvants sont des constituants importants pour tout vaccin et leurs actions sur le système immunitaire innée restent essentielles pour une réponse vaccinale optimale. Ainsi, la compréhension de l'effet isolé de ces adjuvants sur le système immunitaire permettrait une meilleure appréhension de la différence aux réponses vaccinales. Cependant, la concentration d'adjuvant pouvant induire une réponse cellulaire ex-vivo et la durée de stimulation n'étant pas connues, nous proposons dans ce travail d'optimiser la concentration de différents adjuvants pour une stimulation cellulaire optimale.

PREMIERE PARTIE :
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I :

Généralités sur les vaccins

1.1. Généralités

La vaccination est l'administration d'un agent antigénique dans le but de stimuler le système immunitaire d'un organisme vivant afin d'y développer une immunité adaptative contre un agent infectieux. La substance active d'un vaccin est un antigène dont la pathogénicité, dans le cas d'un germe entier, est atténuée afin de stimuler les défenses naturelles de l'organisme (son système immunitaire). La réaction immunitaire primaire permet en parallèle une mise en mémoire de l'antigène présenté pour qu'à l'avenir, lors d'une vraie contamination, l'immunité acquise puisse s'activer de façon plus rapide et plus forte.

1.2. Historique

Bien que des écrits aient rapporté des pratiques similaires à la vaccination depuis le XVII^e siècle en Chine, ce n'est qu'en 1796 avec Edward Jenner que le concept de vaccination a été introduit. En effet, un enfant, préalablement inoculé avec le virus de la vaccine, a été protégé d'une infection subséquente par le virus de la variole, démontrant pour la première fois l'efficacité de ce procédé (7). Par la suite, les travaux se sont concentrés, avec Louis Pasteur et Robert Koch principalement, sur la compréhension du principe d'action de la vaccination et de la relation entre les agents pathogènes et les maladies observées. Par exemple, lors d'une étude effectuée par Louis Pasteur sur le choléra de poule, une erreur a mené à une meilleure compréhension de la vaccination. C'est donc en utilisant une vieille culture de bactéries oubliée sur le comptoir qu'il a démontré que des poulets ayant préalablement été inoculés avec une culture de bactéries affaiblies étaient protégés contre une infection normalement mortelle (8). La suite des recherches effectuées par Louis Pasteur et Robert Koch leur ont permis d'être reconnus, entre autres, pour l'établissement de la théorie des germes et le développement du vaccin contre la rage (9) ainsi que l'élaboration des postulats de Koch respectivement. Il existe

maintenant plus de 25 vaccins autorisés et utilisés de façon courante afin de prévenir bon nombre d'infections virales et bactériennes.

1.3. Définition et principes de la vaccination

La vaccination est un procédé qui vise à préparer le système immunitaire à lutter contre les agents pathogènes. Pour ce faire, les vaccins vont contenir des formes affaiblies ou inactivées des microorganismes contre lesquels le système immunitaire va développer une réponse. Ainsi, lorsque le corps sera infecté par l'agent pathogène visé par le vaccin, les anticorps préformés pourront neutraliser le microorganisme et les lymphocytes B et T mémoires seront rapidement réactivés, ce qui va permettre au système immunitaire de contrôler l'infection, souvent avant même le développement des symptômes. Les vaccins traditionnels couramment utilisés chez l'humain peuvent être classifiés en trois grandes classes ; 1- vivant atténué, 2- inactivé et 3- sous-unitaire.

1.4. Les différents types de vaccins

1.4.1. Les vaccins vivants atténués

Dans les vaccins de type vivant atténué, les pathogènes ciblés ont été altérés et rendus inoffensifs par différentes méthodes afin que notre système immunitaire puisse les contrôler rapidement. Par exemple, il est possible de modifier génétiquement les agents pathogènes afin de diminuer leurs virulences. C'est le cas du vaccin contre la fièvre typhoïde qui est constitué d'une bactérie modifiée génétiquement caractérisée par sa production réduite de LPS (10). L'atténuation peut aussi s'effectuer par la méthode de passage. Cette méthode consiste à cultiver l'agent pathogène dans des conditions différentes de celles de notre corps. C'est le cas du vaccin contre la fièvre jaune et celui contre l'influenza administré par voie intra-nasale. Dans le premier cas, le virus a été passé in vitro plus de 200 fois dans des cellules de différentes espèces animales (singe, souris, poulet) afin de le modifier suffisamment pour le rendre inoffensif (11;12). Pour ce qui est du vaccin contre la grippe, le virus a été sélectionné pour se répliquer

à une température plus faible que 37°C, ce qui fait en sorte qu'il se réplique uniquement dans les voies respiratoires supérieures et qu'il n'est pas en mesure d'infecter les voies respiratoires inférieures, limitant par le fait même sa capacité à causer la grippe (13). En outre, il est aussi possible d'utiliser des microorganismes affectant normalement les animaux. Ceux-ci sont moins bien adaptés à la répllication dans les cellules humaines, mais expriment des antigènes suffisamment similaires pour mener à une protection croisée contre les pathogènes humains. À titre d'exemple, les vaccins contre la tuberculose et la variole sont développés à partir d'agents pathogènes affectant les bovins soit *Mycobacterium bovis* et le virus de la vaccine (Cowpox). Dans les vaccins de type vivant atténué, les microorganismes utilisés sont hautement immunogènes, c'est à dire qu'ils engendrent une forte réponse du système immunitaire. Conséquemment, lorsqu'ils sont comparés à leurs équivalents inactivés ou sous-unitaires, les vaccins de type vivant atténué sont généralement les seuls à être en mesure d'engendrer une réponse immunitaire cellulaire en plus de la réponse humorale et d'octroyer une protection croisée contre des agents pathogènes similaires (14-17). Cependant, ces vaccins ont l'inconvénient de présenter un certain risque de réversion vers un pathogène virulent, en plus de permettre, dans certains cas, le développement de maladies. En effet, lorsque les microorganismes utilisés présentent peu de mutations ou sont constitués d'une population hétérogène, la pression de sélection, combinée aux mutations survenant lors du processus de répllication peuvent mener à l'émergence de microorganismes mieux adaptés ayant retrouvé leur virulence. En outre, puisqu'ils conservent la capacité de se répliquer, le système immunitaire doit intervenir rapidement afin de contenir les microorganismes et de limiter le développement de symptômes. C'est pourquoi ils ne peuvent généralement pas être utilisés chez les personnes immunodéprimées (18). Les vaccins constitués de microorganismes vivants atténués comprennent entre autres le vaccin contre la polio de type Sabin, qui est donné par voie orale, le vaccin contre la grippe

administré par la voie nasale ou encore les vaccins contre la rougeole, la rubéole et la varicelle.

1.4.2. Les vaccins inactivés

Pour ce qui est des vaccins de type inactivé, les pathogènes subissent différents traitements qui visent à les rendre incapables de se répliquer. Ces vaccins sont donc plus sécuritaires que ceux constitués de microorganismes vivants atténués. Les traitements utilisés comprennent : la chaleur, la fragmentation, les modifications génétiques ou encore l'utilisation de produits chimiques. Par exemple, les virus inclus dans le vaccin FLUVIRAL® contre la grippe sont dans un premier temps inactivés par la lumière UV, subissent ensuite un traitement au formaldéhyde et sont fragmentés à l'aide du désoxycholate de sodium (19). Dans le cas du vaccin contre la rage IMOVAX® Rabies, le virus est inactivé par un traitement au bêta-Propiolactone (20). Ces procédés ont cependant le désavantage de pouvoir dénaturer les protéines vaccinales et de diminuer l'immunogénicité des vaccins, rendant l'administration de rappels ou l'utilisation d'adjuvant parfois nécessaire pour octroyer une protection adéquate. Le vaccin contre l'influenza administré par la voie intra-musculaire, celui contre la polio de type Salk, contre la rage ou encore contre l'hépatite A en sont quelques exemples.

1.4.3. Les vaccins sous-unitaires

Enfin, dans le cas des vaccins de type sous-unitaire, seulement des antigènes ou encore des petits fragments du pathogène sont inclus dans le vaccin. Il n'y a donc aucune chance qu'une maladie se développe à la suite de l'administration de ce type de vaccin. Cependant, des recherches approfondies doivent être effectuées afin de sélectionner judicieusement les antigènes qui seront inclus dans le vaccin pour conférer une protection contre la maladie. De plus, ces vaccins sont généralement très faiblement immunogènes et nécessitent plusieurs rappels ainsi que l'ajout d'adjuvant pour assurer leur efficacité. Les vaccins

dans cette catégorie sont assez divers ; ils contiennent des toxines détoxifiées (anatoxines), des molécules de surface de microorganismes ou sont constitués de pseudo particules virales ou d'ADN. Il s'agit par exemple, des vaccins contre le tétanos, l'hépatite B et le virus du papillome humain. Ainsi, le vaccin ADACEL®, permettant de protéger contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche, est composé des anatoxines tétanique, diphtérique et pertussique et de composants acellulaires de *Bordetella pertussis* comme des fimbriae. De plus, ce vaccin est combiné à l'adjuvant phosphate d'aluminium et doit être administré tous les 10 ans afin de maintenir une protection (21). Quant à lui, le vaccin Act-HIB® contre la méningite bactérienne à *Haemophilus influenzae*, qui contient des polysaccharides purifiés conjugués à l'anatoxine diphtérique, doit être administré à quatre reprises pour atteindre des titres d'anticorps suffisamment élevés pour procurer une protection durable (22).

En somme, la majorité des vaccins présentement utilisés chez l'homme engendrent une réponse de type humorale. La production d'anticorps neutralisant les agents pathogènes est d'ailleurs suffisante pour protéger contre plusieurs infections et a fait le succès de nombreux vaccins.

Cependant, dans le cas de certaines maladies comme l'hépatite C, la malaria ou le cancer, la réponse immunitaire est cellulaire et plus particulièrement les lymphocytes T CD8+ sont nécessaires au contrôle de la maladie (23-25). Il y a donc une nécessité la mise en place de nouvelles formulations de vaccins qui permettent d'engendrer le développement d'une réponse cellulaire en plus de la réponse humorale.

Chapitre 2 :

Généralité sur les adjuvants

2.1. Généralités

Le terme adjuvant provient du mot latin adjuvare, signifiant aider. En effet, les adjuvants sont des composés utilisés pour augmenter ou moduler l'immunogénicité de différents antigènes afin d'améliorer l'efficacité des vaccins. Ils peuvent aussi servir à diminuer la quantité d'antigène à utiliser tout en maintenant la même efficacité, ce qui est très utile lorsque les doses de vaccins sont limitées (26;27), à augmenter la rapidité à laquelle la réponse immunitaire se développe (28-30) ainsi que sa durabilité (29;31). Encore peu d'adjuvants sont autorisés pour l'utilisation chez l'homme, mais plusieurs sont en développement ou en essai clinique afin de répondre aux besoins du domaine de la vaccination. Bien que les premiers adjuvants étaient ajoutés aux vaccins sans connaître leurs mécanismes d'action, les études immunologiques des dernières années ont permis de classer les adjuvants en 2 principales classes selon leur mode d'action, soit les systèmes de livraison et les molécules immunomodulatrices. Certains adjuvants peuvent aussi avoir des propriétés appartenant à chacune de ces catégories.

2.2. Les systèmes de livraison

Les systèmes de livraison des vaccins vont faciliter la reconnaissance des antigènes vaccinaux ainsi que leur phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes. Il peut s'agir de molécules qui sont ajoutées aux vaccins telles que les sels d'aluminium et les émulsions. L'antigène peut aussi être directement associé à des anticorps ou des pseudo particules virales. Le choix du système de livraison peut affecter la stabilité, la reconnaissance par les cellules immunitaires ainsi que l'innocuité des vaccins et donc influencer sa réussite ou son échec.

2.2.1. Les sels d'aluminium

Les sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium et phosphate d'aluminium) sont les premières molécules qui ont été identifiées comme pouvant augmenter l'efficacité des vaccins (32). Ils sont utilisés depuis plus de 80 ans et ont été administrés à des millions de personnes, ce qui en fait un des adjuvants les plus utilisés et les plus sécuritaires jusqu'à présent. La capacité des sels d'aluminium à augmenter la production d'anticorps lorsqu'ajouté à un vaccin est bien connue. Cependant, cela ne fait qu'une vingtaine d'années que des équipes de recherche se sont intéressées à l'élucidation de son mécanisme d'action et celui-ci reste encore controversé. En général, les deux principaux effets observés lors de l'ajout de molécules dérivés de l'aluminium aux vaccins sont l'augmentation de la phagocytose des antigènes vaccinaux et l'induction d'inflammation (33;34). Pour ce faire, les antigènes doivent être en association avec les molécules d'aluminium, mais leur adsorption ne semble pas toujours nécessaire (33;35-40). Dans cette situation, les antigènes ne sont plus solubles, mais plutôt agglomérés en particules de taille adéquate pour faciliter leur phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes, en plus de favoriser leur persistance (33;40;41). D'un autre côté, les sels d'aluminium semblent aussi avoir un effet immunomodulateur. Ils peuvent recruter des cellules immunitaires au site d'injection (42-45) et induire la production d'acide urique, probablement en causant la nécrose ou des dommages à des cellules au site d'injection (42;43), ce qui mène à l'activation de l'inflammasome et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (44;46-49). L'activation de cette voie peut aussi être induite directement par les cristaux d'aluminium (50). Récemment, l'équipe de Robert J. Benschop a aussi démontré que l'alun engendre de la nécrose cellulaire, ce qui mène à la production d'IL-33 qui peut participer à l'amélioration de la réponse immunitaire humorale en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (51). Cependant, dans cette étude l'action de l'IL-33 n'est pas nécessaire au pouvoir adjuvant d'alun. Ainsi, bien que des études in

vitro ont démontré que les adjuvants à base d'aluminium ne sont pas en mesure d'activer directement les cellules présentatrices d'antigènes (44;52), des études effectuées in vivo ont démontrées qu'il y avait production de motifs moléculaires associés au danger (DAMP) menant à l'activation du système immunitaire inné (53). Enfin, les sels d'aluminium sont reconnus comme des adjuvants sécuritaires et efficaces pour augmenter la production d'anticorps entre autres en activant la réponse Th2 (54-56) , mais ils ne sont pas en mesure, à eux seuls, d'augmenter la réponse immunitaire cellulaire, mettant en lumière le besoin de développer de nouveaux adjuvants (57;58).

2.2.2. Les émulsions

Les émulsions sont un autre type d'adjuvant qui est présentement inclus dans les vaccins en utilisation ou en développement. Elles peuvent être constituées d'une émulsion d'eau dans l'huile ou d'huile dans l'eau avec de l'huile de source minérale, végétale, animale ou synthétique. Actuellement, seules les émulsions à base de squalène, une huile d'origine animale, sont autorisées. Il s'agit du MF59 dans le vaccin antigrippale FLUAD® autorisé dans une trentaine de pays, ainsi que l'AS03 qui a été utilisé dans plusieurs vaccins contre le virus influenza pandémique H1N1 de 2009. L'ajout du MF59 au vaccin saisonnier contre la grippe avait pour but d'augmenter l'efficacité de la vaccination saisonnière chez les personnes âgées ainsi que les jeunes enfants, alors que l'utilisation de l'AS03 a permis de diminuer la quantité d'antigènes nécessaires pour mener à une protection efficace dans une situation où les doses de vaccins étaient limitées. Tout comme les sels d'aluminiums, ces adjuvants ont eux aussi été administrés à des millions de personnes et sont considérés très sécuritaires en plus d'avoir démontré leur capacité à augmenter l'efficacité des vaccins contre la grippe (59-61) et même à potentiellement élargir la protection conférée par le vaccin à des souches de virus hétérologues (62;63). Encore une fois, le mécanisme d'action de ce type d'adjuvant n'est pas complètement élucidé. Des

études ont démontré que le MF59 forme des gouttelettes qui sont phagocytées par les cellules présentatrices d'antigènes dont les cellules dendritiques (64). Celles-ci augmentent la phagocytose des antigènes vaccinaux et la production d'anticorps spécifiques (64;65). Cependant, contrairement aux sels d'aluminium, l'association des antigènes avec les gouttelettes lipidiques ne semble pas nécessaire à l'effet adjuvant du MF59 (66). Le MF59 induit aussi le recrutement de cellules immunitaires au site d'injection, ce qui peut faciliter la phagocytose et le transport des antigènes aux ganglions drainants, et module un nombre important de gènes reliés à l'inflammation dont des chimiokines et des récepteurs de chimiokines et ce, de façon plus importante que l'alun ou les oligodesoxynucleotides contenant des motifs CpG non méthylés (CpG ODN) (45). En fait, le MF59 est généralement considéré comme un adjuvant plus efficace que l'alun pour augmenter la production d'anticorps et la réponse T CD4+ (67). Il semble donc que l'injection du MF59 engendre l'établissement d'un environnement favorable au développement de la réponse immunitaire humorale. Cependant, le mécanisme d'action exact du MF59 n'a pas encore été identifié. Par contre, des études ont démontré que contrairement aux sels d'aluminium le pouvoir adjuvant du MF59 ne dépend pas directement de l'inflammasome, mais est diminué par l'absence de la signalisation TLR ou de la protéine adaptatrice de l'inflammasome ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) (68). D'autres types d'émulsions ont aussi été développés et étudiés, mais ne sont pas présentement utilisées chez l'humain, comme les émulsions d'eau dans l'huile de type montanide ou encore celles utilisées dans les adjuvants complet et incomplet de Freund. Bien que l'adjuvant complet de Freund, contenant des fragments de *Mycobacterium tuberculosis* tuées dans une émulsion d'eau dans l'huile, soit l'un des adjuvants les plus efficace pour augmenter autant la réponse immunitaire humorale que cellulaire, la forte toxicité qu'il engendre (inflammation persistante, nécrose tissulaire, ulcération) empêche son utilisation chez l'humain (69). En revanche, l'absence

des bactéries tuées dans l'adjuvant incomplet de Freund, réduit la toxicité de cet adjuvant, mais aussi son efficacité (70). Enfin, le montanide est en mesure d'augmenter les réponses immunitaires humorales et cellulaires (30;71-73), mais il est toujours en évaluation quant aux effets secondaires qu'il engendre (74).

2.2.3. Les liposomes

Les liposomes sont composés d'une bicouche lipidique en forme de sphères immunologiquement inertes, biodégradables et non toxiques qui ont été utilisés pour la première fois en 1974. Comme pour les autres adjuvants de type système de livraison, l'utilisation de liposomes a pour effet d'augmenter la phagocytose des antigènes vaccinaux qui y sont incorporés. Dans ce cas précis, la reconnaissance et la phagocytose des liposomes par les cellules présentatrices d'antigènes, plus particulièrement les macrophages, se fait soit via le récepteur Fc ou encore grâce au système du complément (75). À la suite de leur phagocytose, les antigènes vaccinaux sont dégradés et peuvent emprunter la voie de présentation sur le CMH-II, mais peuvent aussi être présentés de façon croisée au niveau du CMH-I (76;77). La formulation des antigènes vaccinaux dans les liposomes a aussi l'avantage d'augmenter l'immunogénicité de petits peptides (78), de diminuer la quantité d'antigène requise pour engendrer la prolifération des lymphocytes T (76) et de limiter la toxicité de certaines molécules (79). En outre, les liposomes sont un outil très versatile dont l'efficacité est dépendante de leurs tailles ainsi que leurs compositions. En effet, la taille des liposomes formés peut grandement affecter la phagocytose de ces vésicules et ainsi avoir un impact au niveau de la réponse immunitaire (80), alors que l'ajout de phosphatidylsérine dans la bicouche lipidique augmente la phagocytose des liposomes (80). Cependant, les liposomes ne sont généralement pas suffisamment immunogènes pour être utilisés seuls, ce qui fait en sorte qu'ils sont régulièrement combinés avec des molécules

immunomodulatrices comme le MPL ou des cytokines afin d'augmenter leur efficacité (81-84). En outre, l'utilisation des liposomes a aussi évolué vers le développement de virosomes, c'est à dire de liposome contenant des glycoprotéines d'enveloppes virales. Cette méthode s'est avérée très efficace pour améliorer la protection contre le virus de l'influenza, et ce particulièrement chez les personnes âgées et les enfants, tel que démontré par la réduction du nombre d'hospitalisations et de pneumonies observées dans différentes études cliniques effectuées en Europe (85;86). Ces résultats prometteurs ont d'ailleurs mené à la commercialisation du vaccin antigrippal Inflexal V® en Europe et en Asie. De plus, la formulation en liposomes d'un vaccin ciblant l'antigène tumoral mucin 1, surexprimé dans plusieurs cas de carcinome pulmonaire, augmente la durée de vie des patients et est maintenant en essai clinique de phase III (87;88). Enfin, la formulation du peptide MPER, dérivé de l'antigène gp41 du virus de l'immunodéficience humaine, à l'aide de liposomes s'est révélée être la seule méthode permettant le développement d'anticorps spécifiques, en comparaison avec l'utilisation d'alun, ou d'émulsion à base de squalène ou de montanide et ce même lors de combinaison avec des molécules immunomodulatrices (83). Cette même équipe a aussi mis en évidence la versatilité des liposomes en démontant la possibilité d'ajouter du MPL ou encore un peptide helper, permettant de stimuler les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, aux vésicules afin d'obtenir une réponse immunitaire optimale (83). Les liposomes sont donc un outil à considérer dans le développement de nouveaux vaccins.

2.2.4. Les pseudo particules virales

Les VLP sont des particules virales qui ne contiennent pas de matériel génétique infectieux. En effet, selon le mode de production et le type de virus utilisé, ces particules peuvent soit être totalement dépourvu d'acide nucléique (89;90), contenir des acides nucléiques contaminants (91;92), ou posséder un acide

nucléique viral ou synthétique qui ne mène pas à la production de particules virales infectieuses pour l'humain (93;94). Ainsi, il n'y a pas de réplication virale, ce qui en fait un outil sécuritaire. La majorité des VLP présentement utilisés en vaccination sont une version non répliquative du virus contre lequel on veut monter une réponse immunitaire. C'est entre autres le cas des trois vaccins constitués de VLP qui sont utilisés chez l'humain : le vaccin contre l'hépatite B, le virus du papillome humain et celui contre l'hépatite E autorisé en Chine. Ils sont tous les trois composés des protéines de capsid des virus ciblés et ne contiennent pas d'acide nucléique (95-97). La production de vaccins sous forme de VLP est aussi fréquemment utilisée dans le développement de vaccins contre le virus de l'influenza. Cela a l'avantage de mener au développement d'une réponse immunitaire plus forte et plus large en comparaison avec l'utilisation de virus inactivés ou de protéines recombinantes de l'hémagglutinine (91;98). En effet, des titres d'anticorps plus élevés et reconnaissant une plus grande gamme de virus distincts sont générés avec cette méthode. L'utilisation de VLP permet aussi d'éviter l'utilisation de traitements chimiques pour inactiver les particules et conserve la conformation native des antigènes. En outre, une réponse immunitaire de type Th1 et une protection contre l'infection par les souches homologues et hétéro sous-typiques du virus ont été observées avec l'utilisation de VLP (99) (91;100;101). Enfin, la production du vaccin contre la grippe en VLP permet d'éviter la méthode basée sur l'utilisation d'œufs, qui est longue, coûteuse et dépend de l'approvisionnement en œufs (102;103). De plus en plus d'équipes de recherche utilisent aussi les protéines de capsid de différents virus, comme celles du virus de l'hépatite B, pour les modifier génétiquement ou chimiquement afin d'exprimer des antigènes étrangers et ainsi de s'en servir comme plateforme vaccinale (104-106). Cela permet entre autres de monter une réponse immunitaire contre des épitopes hautement conservés entre les souches de virus influenza, comme M2e, qui sont normalement faiblement immunogènes (107-109). Les VLP sont aussi étudiées pour la création de

vaccin contre l'hépatite C, le mélanome, Ebola ou encore la malaria, afin de répondre aux besoins non comblés (110-113). Les VLP servent donc de transporteur pour diriger de façon adéquate les antigènes vaccinaux aux cellules immunitaires. En fait, puisqu'elles sont physiquement similaires aux virus, tant au niveau de la taille que de la forme, la reconnaissance des antigènes vaccinaux par les APC en est facilitée (26;114-116). En outre, ces propriétés leur permettent aussi de diffuser librement jusqu'aux ganglions drainants le site d'injection pour être phagocytés par les cellules s'y trouvant comme les cellules dendritiques CD8+, impliquées dans le développement de la réponse immunitaire cellulaire (117). De plus, la présentation croisée des antigènes est aussi possible et mène au développement de lymphocytes T CD8+ spécifiques (118-121). L'utilisation de VLP permet aussi d'augmenter la réponse immunitaire humorale générée contre les antigènes exprimés à la surface des particules en comparaison aux antigènes utilisés seuls sous forme de protéines ou de peptides (103). Bien que la présentation des antigènes vaccinaux sous forme de VLP ait un effet adjuvant, plusieurs vaccins à base de VLP requièrent la co-administration d'un adjuvant de type immunomodulateur pour être pleinement efficaces (103;104;106). C'est d'ailleurs le cas des trois vaccins VLP autorisés qui contiennent des sels d'aluminium et/ou du MPL (95-97). Cependant, certaines VLP ont des propriétés immunomodulatrices intrinsèques et sont en mesure d'activer les cellules immunitaires innées, rendant l'ajout de molécules activatrices non nécessaire. Les VLP possèdent donc plusieurs propriétés intéressantes pour le développement de nouveaux vaccins plus efficaces et sécuritaires.

2.2.5. Les anticorps

Dans la catégorie des adjuvants de type système de livraison, l'utilisation des anticorps a fait récemment son apparition. Ces anticorps ont pour but d'amener les antigènes vaccinaux spécifiquement à des cellules cibles, comme les cellules

présentatrices d'antigènes, en ciblant des molécules exprimées à la surface de ces cellules, plus particulièrement des récepteurs endocytiques. Il s'agit, entre autres, des anticorps ciblant DEC-205, DC-SIGN, Clec9A, Dectin-1 ou DCIR dont l'expression est majoritairement restreinte aux cellules dendritiques (122-126). Ainsi, la fusion d'un antigène (protéine ou peptide) à un anticorps reconnaissant ce type de récepteur permet dans un premier temps la phagocytose de l'antigène, puis sa présentation au niveau des CMH de classe II, mais aussi au niveau du CMH-I par le phénomène de présentation croisée (127-129). Par la suite, il y a une présentation efficace des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ce qui mène au développement d'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique (130;131) en plus de fournir l'aide nécessaire à la réponse immunitaire humorale dans le cas de vaccins protéiques (132). Il est important de noter que dans le contexte de vaccination, les antigènes couplés à des anticorps ciblant des récepteurs endocytiques exprimés par les cellules dendritiques ne peuvent être utilisés seuls, car une réponse immunitaire de tolérance sera induite (130;133). Ainsi, il faut coupler l'utilisation de ces anticorps avec des molécules activant les cellules dendritiques comme un anticorps anti-CD40, du poly (I:C), des CpG ODN ou le resiquimod (130;132;134;135). Cette technique a donné des résultats prometteurs dans des contextes de prévention d'infections virales, mais aussi de traitement du cancer qui nécessite le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et est présentement en essai clinique (134-137). Finalement, de récentes études ont démontré qu'il était aussi possible d'extrapoler cette technique aux bactériophages ou aux nanoparticules afin de favoriser la présentation croisée des antigènes présentés dans ces systèmes et ainsi induire le développement de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques (129;138;139).

2.3. Les immunomodulateurs

Lors d'une infection, le système immunitaire inné est activé suite à la détection de motifs associés aux pathogènes (PAMPS) par des PRR. Cette reconnaissance mène à une réponse de type inflammatoire qui contribue au développement de la réponse immunitaire adaptative. Dans un contexte de vaccination, l'administration du vaccin a pour but de mimer la présence d'un agent pathogène, sans pouvoir causer une réelle infection. Ainsi, l'ajout de PAMPS ou de molécules inflammatoires pouvant simuler la présence d'un agent pathogène est tout indiqué afin de développer une réponse immunitaire qui sera efficace pour contrôler une infection subséquente.

2.3.1 Les ligands de PRR

Les ligands de PRR ont la propriété commune d'activer les cellules du système immunitaire inné. Ce processus est caractérisé par l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation par les APC et la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, selon le type de ligand de PRR utilisé, des différences majeures dans les populations de cellules immunitaires activées ainsi que le type de cytokines produites sont observées, ce qui se répercute ultimement sur le développement de la réponse immunitaire adaptative et donc leur pouvoir adjuvant (140-142). Parmi les ligands de PRR, ceux qui activent les TLR sont les plus étudiés. Un total de dix TLR (TLR1-10) ont été identifiés chez l'humain, alors qu'il y en a douze chez la souris (TLR1-9, TLR11, TLR12 et TLR13). Les TLR sont exprimés au niveau des cellules immunitaires, dont les macrophages, les DC et les lymphocytes B, mais aussi chez d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes et les cellules épithéliales. La majorité des TLR sont situés à la surface des cellules ; seuls les TLR3, 7, 8, 9 et 13 sont localisés dans les endosomes. De plus, à l'exception du TLR3 et parfois du TLR4 qui peuvent faire intervenir les molécules adaptatrices TRIF et TRAM, tous les TLR signalent à l'aide de la molécule adaptatrice

MYD88. Suite à l'activation des TLR de surface, MYD88 est recrutée au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur, ce qui résulte en une cascade de signalisation menant à la translocation au noyau des facteurs de transcription NF- κ b et AP-1 puis à la production de cytokines pro-inflammatoires (143). Dans le cas des TLR endosomaux, leur activation peut induire la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi plus particulièrement d'IFN-I. En effet, l'activation du TLR7 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) induit la formation d'un complexe avec IRAK-1, TRAF6, TRAF3, IKK- α et IRF7, ce qui mène à la phosphorylation et la dimérisation d'IRF7 qui transloque alors au noyau pour activer l'expression des gènes codant pour l'IFN-I (144). Pour sa part, l'activation du TLR3, recrute la molécule adaptatrice TRIF au domaine cytoplasmique du récepteur et induit la formation d'un complexe composé de TRAF3, TANK et NAPI, permettant ensuite à TBK1 et IKK ϵ de phosphoryler IRF3 qui va se dimériser et migrer au noyau pour mener à la production d'IFN-I (144).

Parmi les ligands de TLR, le MPL, un dérivé non toxique des lipopolysaccharides (LPS), a été commercialisé par GSK et est utilisé en combinaison avec Alun dans leurs vaccins dirigés contre le virus du papillome humain et l'hépatite B (145;146). Il s'agit d'un agoniste du TLR4, qui a des propriétés adjuvantes similaires au LPS, mais qui est dépourvu de sa toxicité (147;148). Le MPL est reconnu pour recruter et activer les APC et mener à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'IL-6 (149;150). De plus, des études ont démontré sa capacité à augmenter la production d'anticorps spécifiques, mais aussi à engendrer la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4 $^{+}$ et donc de diriger la réponse vers un profil Th1 (151;152). Le MPL connaît un bon succès lorsqu'il est combiné à l'Alun dans les vaccins commerciaux de GSK, mais sa

capacité à soutenir le développement de la réponse T CD8+ n'a pas été clairement démontrée (146;153-155).

Le TLR2, un autre récepteur situé à la surface des cellules, reconnaît les molécules situées dans la membrane des bactéries comme le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque ou les lipoprotéines (156). L'utilisation des lipopeptides tels le Pam3Cys comme adjuvant a démontré de bonnes propriétés immunomodulatrices (156), en plus de stimuler l'immunité mucoale (157). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours avec le Pam3Cys pour le développement de vaccins contre la malaria, le VIH ou l'hépatite B. De plus, les lipopeptides ont démontré une bonne capacité à améliorer autant la réponse immunitaire humorale que cellulaire (158;159). Cependant, comme les récepteurs situés à la surface des cellules répondent à des pathogènes extracellulaires, ils ont normalement tendance à mener majoritairement à la production d'anticorps spécifiques et de lymphocytes T CD4+ de type Th2, mais peu à la génération de lymphocytes T CD8+ (140;160-162). Ainsi, un grand intérêt est porté aux récepteurs endosomaux comme le TLR3, le TLR7/8 et le TLR9 impliqués dans la reconnaissance des pathogènes intracellulaires. Les ligands naturels des TLR3, 7/8 et 9 sont l'ARN double brin, l'ARN simple brin et l'ADN non méthylé respectivement (163-165). Ces différentes formes d'acides nucléiques correspondent au génome ou à des intermédiaires de réplication des agents pathogènes infectant les cellules. L'activation de ces récepteurs endosomaux mène à la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi d'IFN-I, crucial pour la présentation croisée des antigènes vaccinaux et le développement de lymphocytes T CD8+ spécifiques (166;167). En plus des ligands naturels, différents ligands synthétiques ont été développés pour activer les TLR3, 7/8 et 9, soit le poly (I :C), les imidazoquinolines et les CpG ODN respectivement. Ces ligands ont démontré un grand potentiel en tant qu'adjuvant pour améliorer la réponse immunitaire humorale, mais aussi une

capacité à engendrer une réponse immunitaire cellulaire contre les antigènes vaccinaux, ce qui leur a permis de générer des résultats prometteurs dans le développement de vaccins nécessitant des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) comme le cancer, la tuberculose ou la malaria (168-171). Cependant, les premières versions de ces adjuvants comportaient certains inconvénients. Par exemple, ils sont très sensibles à la dégradation par les nucléases, présentes en grande quantité dans les liquides biologiques, en plus de causer beaucoup de toxicité (fièvre, libération d'enzyme hépatique, inflammation systémique, hypotension), ce qui limite les bénéfices reliés à leur utilisation (172-176). Toutefois, des recherches intensives ont été réalisées afin d'améliorer ces adjuvants et différentes solutions ont été identifiées. D'une part, la création de molécules dérivées, plus stables, permet d'avoir des adjuvants plus résistants à la dégradation, mais aussi moins toxique (177;178). D'autre part, la combinaison de ces adjuvants avec des systèmes de livraison tels que les liposomes, des microsphères ou des nanoparticules permet de les protéger de la dégradation tout en ciblant leur phagocytose par les cellules du système immunitaire inné, ce qui augmente leurs propriétés adjuvantes tout en limitant leur toxicité (179-183). Enfin, les molécules immunomodulatrices non reliées aux TLR comme les ligands des récepteurs NOD, CLR, RIG-I ou STING sont aussi évaluées comme adjuvants pour les vaccins, mais sont à un stade de recherche moins avancé (184;185).

2.4. La combinaison des adjuvants

Le vaccin vivant atténué contre la fièvre jaune (YF-17) est le vaccin le plus efficace créé jusqu'à ce jour. En effet, il a une efficacité de plus de 98%, engendre le développement d'anticorps neutralisants protecteurs à très long terme et mène au développement d'une réponse T cytotoxique spécifique (186;187). Ainsi, les chercheurs se sont intéressés à comprendre le mécanisme d'action de ce vaccin afin de pouvoir créer de nouveaux vaccins plus efficaces.

Ces études ont permis de mettre en évidence l'importance de la stimulation du système immunitaire innée ainsi que l'activation simultanée de plusieurs TLR pour avoir un effet optimal (188;189). En général, les vaccins qui simulent le plus fidèlement l'infection sont les plus efficaces et donc l'utilisation de vaccins vivants atténués semble être le meilleur choix pour le développement d'une réponse immunitaire protectrice à long terme. Cependant, ce type de vaccin est de plus en plus délaissé au profit des vaccins de type sous-unitaire, plus sécuritaires, mais moins immunogènes, auxquels l'ajout d'un adjuvant est crucial. Avec l'augmentation de la compréhension des mécanismes d'action des différents adjuvants ainsi que l'évaluation de leur efficacité respective, les différents avantages et inconvénients de chacun ont été identifiés et le bénéfice de combiner plus d'un type d'adjuvant pour un même vaccin afin d'obtenir une efficacité optimale a été mis en évidence. Ainsi, de façon analogue au vaccin YF-17, l'équipe de Bali Pulendran a démontré que la combinaison de plusieurs ligands de TLR avait un effet synergique sur le développement de la réponse immunitaire humorale en contexte de vaccination (190). Ce phénomène a aussi été observé par l'équipe du Dr Robert Seder dans un contexte de vaccin à médiation cellulaire (168). En effet, l'utilisation d'un ligand de TLR7/8 permet d'activer plusieurs types de DC et de maximiser la réponse immunitaire. En ce sens, la compagnie InvivoGen a développé des molécules qui contiennent plusieurs ligands de PRR.

De façon similaire, une combinaison non seulement de différents ligands de TLR, mais aussi de différents types d'adjuvants a été observée ces dernières années et a menée à des résultats prometteurs. En effet, comme les systèmes de livraison et les immunomodulateurs ont des mécanismes d'actions différents, mais complémentaires, leur association peut avoir de grands avantages. C'est entre autres le cas de l'adjuvant autorisé ASO4, une combinaison entre un système de livraison et une molécule immunomodulatrice, qui permet

d'augmenter significativement l'efficacité des vaccins en comparaison avec l'utilisation d'un seul adjuvant (149;153;191;192). De façon analogue, lors d'un essai de développement d'un nouveau vaccin plus efficace contre la tuberculose, l'administration concomitante de CpG ODN et d'alun a menée à un effet synergique en améliorant la production d'anticorps et s'est révélé être le seul traitement en mesure d'engendrer une augmentation significative du nombre de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ (193). L'incorporation de CpG ODN dans des nanoparticules s'est révélée aussi très efficace pour potentialiser l'effet de cet agoniste du TLR9. En fait, cela permet d'obtenir une meilleure capacité à augmenter la réponse cellulaire et de diminuer la quantité de CpG ODN utilisé, ce qui pourrait potentiellement diminuer les effets secondaires causés par cet adjuvant (194). Cependant, il ne suffit pas de combiner un système de livraison avec un immunomodulateur pour avoir de bons résultats. En effet, plusieurs exemples illustrent l'importance du choix du système de livraison selon le type de réponse immunitaire recherchée. Par exemple, lorsque le MPL est en formulation avec des liposomes il augmente la réponse cellulaire, alors que ce n'est pas le cas lorsqu'il est dans une émulsion d'huile dans l'eau (195;196). D'un autre côté, la formulation du GLA (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant), un ligand de TLR4, sous forme aqueuse, en liposome ou en émulsion d'huile dans l'eau, peut avoir un gros impact sur la génération de la réponse cellulaire, alors que la réponse humorale n'est pas affectée par ce changement (197). Ainsi, l'élucidation des mécanismes d'action des différents adjuvants et des interactions qu'ils peuvent avoir entre eux met en lumière l'importance du choix du ou des adjuvants qui seront incorporés aux vaccins afin de maximiser les chances de réussite.

Chapitre 3 :

Immunité et environnement

3.1. Réponse immunitaire et facteurs environnementaux

Le compartiment des cellules T CD4⁺ est d'une hétérogénéité particulière, pas seulement en termes de spécificité antigénique, mais aussi en termes de phénotype et fonctions effectrices (198-200). Ces caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles peuvent être modulés par de multiples facteurs dont l'immunité innée, l'environnement, la durée et le degré d'exposition aux microorganismes (201;202). La plupart des études immunologiques se font sans tenir compte des spécificités environnementales. En effet dans des études évaluant les réponses cellulaires T à des antigènes vaccinaux, il a été montré une grande hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des différentes sous-populations cellulaires selon les cohortes (203;204), montrant ainsi que l'évaluation simultanée de plusieurs attributs de la réponse cellulaire est nécessaire pour mieux prédire une réponse immunitaire contre une infection ou un vaccin, surtout sur des populations vivant dans des environnements différents.

Le système immunitaire a évolué pour faire face à des microorganismes de plus en plus divers pour assurer la survie des espèces. Par rapport aux adultes, les nouveau-nés sont plus sensibles à de nombreuses maladies en raison de leur interaction moins prolongée à l'environnement (205;206). Le développement de la réponse cellulaire dans l'enfance nécessite des molécules immunomodulatrices impliquées dans l'interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, telles que le Program Death-1 (PD-1)/Program Death Ligands (PD-Ls), ainsi que l'interaction entre les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs) (207) et les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs) pour permettre le développement de réponse immunitaire appropriée (208;209). Il a été montré que l'exposition des enfants aux microorganismes ainsi que d'autres influences, notamment l'origine géographique, le type régime alimentaire et le mode de vie contribuent à la

maturation du système immunitaire et orientent par conséquence la réponse immunitaire ultérieures (210;211). Contrairement aux bactéries, les parasites tels que les schistosomes, les ascaris, les trichiures, les ankylostomes et les infections par les vers filaires peuvent envahir de manière chronique l'hôte humain installant un processus d'immunomodulation qui peut aussi avoir un impact sur la réponse aux différents pathogènes (212;213).

Lorsqu'elles sont confrontées à un microorganisme, les cellules T CD4+ peuvent présenter des phénotypes pro-inflammatoires capables de protéger contre l'immunopathologie associée aux infections (214). Dans l'étude de Wagar et al, une cohorte d'enfants américains n'a présenté qu'un seul cas de cytomégalovirus (CMV) positif, alors que 83 % des enfants du Bangladesh étaient positifs avant 1 an, ce qui indique une augmentation des phénotypes des cellules T effectrices (granzyme B, perforine et expression de CD57) et une production plus importante d'IL-8 et de TGF- β parmi de multiples types de cellules immunitaires chez les enfants bangladais. L'implication selon laquelle l'infection par le CMV peut stimuler la réponse immunitaire des humains pourrait être renforcée par la découverte que les souris infectées par le CMV murin étaient substantiellement protégées contre une infection grippale ultérieure (215). C'est pourtant chez les enfants bangladais que la production de TGF- β peut apporter un bénéfice protecteur dans l'intestin en régulant la fonction inflammatoire de diverses cellules immunitaires et non immunes (216).

L'étude du déroulement dans le temps a montré de façon intéressante que les phénotypes immunitaires des enfants américains restaient inchangés après 2 ans alors que ceux des enfants bangladais étaient beaucoup plus variables, surtout à 1 an, ce qui semble conforme à l'hypothèse de l'hygiène. Les fortes différences entre les enfants bangladais et américains grâce à une production réduite de cytokines et à une différenciation accrue des lymphocytes T chez les enfants bangladais de 2 ans (217) pourraient permettre de trouver un moyen de se

protéger contre les dommages inflammatoires pathologiques dans un environnement à forte teneur en agents pathogènes.

Le moment et la contribution des infections chroniques peuvent également jouer un rôle important dans le façonnement de l'immunité adaptative. Il a été démontré que l'exposition à des microbes est un signal important pour le développement immunitaire au cours de la petite enfance (218) ainsi que pour l'augmentation de la réponse immunitaire prolongée à l'âge adulte (214). La forte prévalence endémique des maladies infectieuses est en effet considérée comme l'une des principales caractéristiques de la situation sanitaire en Afrique et dans d'autres pays en développement (219). L'exposition microbienne plus importante dans les milieux à faibles revenus pourrait expliquer, au moins en partie, la prévalence plus faible des maladies chroniques dans les zones rurales africaines grâce à la maturation précoce des réponses immunitaires innées et adaptatives (220).

2.2. Hypothèse hygiénique

Au cours des dernières décennies, une augmentation globale de la prévalence de nombreuses maladies inflammatoires a été notée dans les pays développés (221;222). Vu que les allergies sont plus fréquentes dans les pays industrialisés (223) et que leur prévalence devient de plus en plus élevée dans les pays en voie de développement qui connaissent une urbanisation galopante et des changements importants de mode de vie (224), une relation causale entre le profil immunologique et les changements environnementaux pourrait être envisagée. Bien que les prédispositions génétiques de l'hôte puissent conditionner la survenue de ces maladies (225-227), ces polymorphismes seuls ne peuvent pas expliquer la rapide évolution de ces syndromes inflammatoires et allergiques. En effet la diététique, l'hygiène de vie, un environnement riche en polluants et allergènes ainsi que l'exposition à des charges importantes de parasites et autres microorganismes pourraient affecter la dynamique de notre

système immunitaire. La théorie de « l'hypothèse hygiénique » suggère que l'exposition précoce à d'importantes charges microbiennes pourrait être un facteur protecteur car permettrait de développer l'immunité, tandis que les personnes ayant un mode de vie les mettant à l'abri de nombreux microorganismes seraient plus susceptibles à certaines maladies (228;229). Cette hypothèse a été réconfortée par plusieurs études montrant des différences géographiques de certaines pathologies comme l'asthme et de sarcoïdose chez des sujets appartenant au même groupe ethnique (230).

Dans les pays en développement, en particulier dans les zones rurales, les conditions environnementales telles que l'exposition à de multiples microorganismes ainsi que l'état nutritionnel sous-optimal influent sur le système immunitaire [8, 9]. L'urbanisation est souvent associée à une perte de mode de vie traditionnel, à des changements d'habitudes alimentaires et à moindre mesure, à une diminution de l'exposition aux micro-organismes et aux parasites. L'impact du processus d'urbanisation et du mode de vie sur le système immunitaire a été bien illustré par des différences majeures observées dans les profils transcriptionnels des leucocytes. En effet, une étude chez les Berbères Amazighs du Maroc vivant dans trois zones géographiquement distinctes a montré que jusqu'à un tiers du transcriptome leucocytaire est associé à la différence régionale [10], indiquant ainsi l'impact non négligeable de l'environnement sur le système immunitaire. Des études sur des jumeaux ont montré que des facteurs autres que génétiques jouent un rôle dans la survenue de plusieurs pathologies (231), la réponse aux vaccins (232) ou sur le développement des cellules de l'immunité (233) et la production de cytokines (234).

2.3 Environnement et réponse vaccinale

Bien que les vaccins aient joué un rôle important dans la lutte contre les maladies infectieuses, des efforts restent encore à faire dans la recherche pour plus de 25 agents pathogènes d'intérêt médical contre lesquels il n'y a pas encore de vaccin. Il s'agit entre autres de l'infection par le VIH, du paludisme, des maladies tropicales négligées ainsi que des maladies émergentes et ré-émergentes qui présentent des problèmes majeurs de santé publique (235). En effet, il existe une différence considérable l'exposition environnementale selon que l'on vit dans une zone rurale, urbaine ou semi-urbaine d'un pays en développement ou dans un pays développé (236). L'une des preuves les plus évidentes de l'impact géographique sur la réponse immunitaire est que les vaccins ne réussissent pas partout de la même manière (237-239). En effet, plusieurs vaccins apparaissent moins efficaces dans les pays en développement que dans les pays industrialisés (240). Outre l'âge, le sexe, la race, la qualité des vaccins, le nombre de doses administrées et la voie d'immunisation, qui peuvent influencer sur la réponse et l'efficacité des vaccins, il est admis que la principale raison de ces variations l'exposition différentielle à l'environnement (240). Avant leur introduction dans les pays en développement, la plupart des vaccins sont d'abord testés en Europe ou aux États-Unis ; par conséquent, les résultats des essais cliniques pourraient ne pas refléter les réponses observées dans d'autres zones géographiques différentes.

DEUXIEME PARTIE :TRAVAIL PERSONNEL

Chapitre 1 :

Matériel et méthode

1.1 Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail était d'optimiser la stimulation d'adjuvants pour la stimulation *ex-vivo* des PBMC d'européen (Leiden) et de Sénégalais (Pakh) afin d'évaluer concentrations à utiliser pour l'étude de la différence géographique de la réponse immunitaire.

1.2. Méthodologie

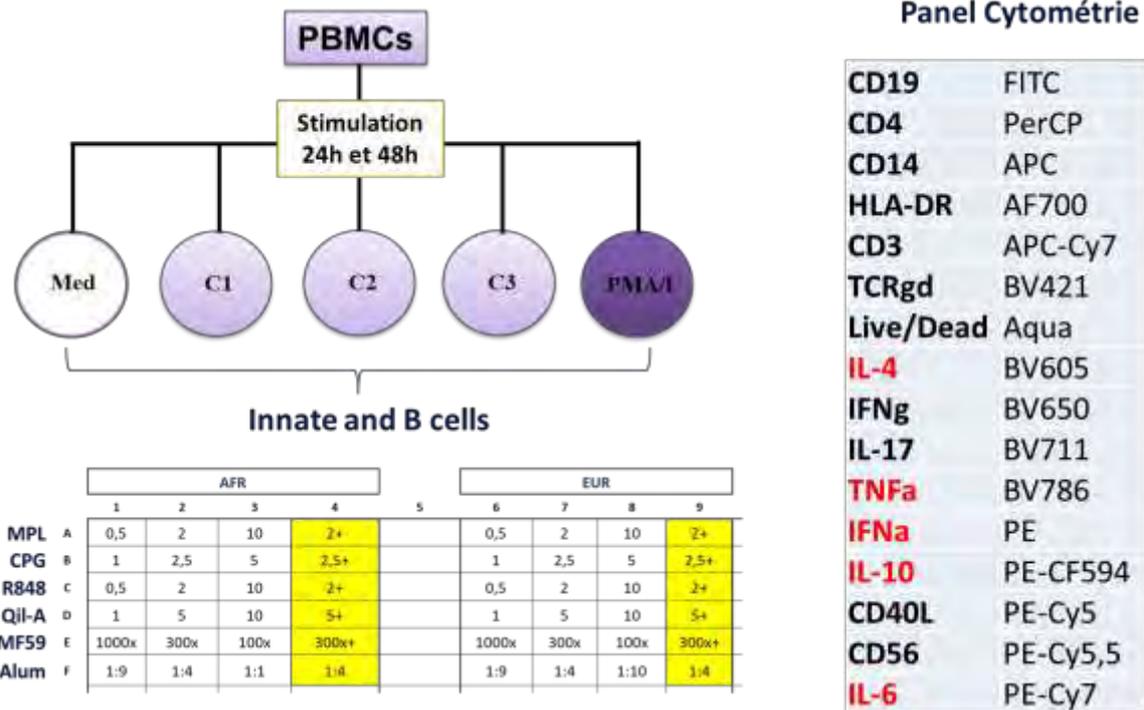


FIGURE 1: Méthodologie générale

1.2.1. Séparation cellulaire

Les stimulations ont été effectués sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Les PBMC ont été isolées par gradient de Ficoll à partir de 16ml de sang prélevé sur tube hépariné dans les quatre heures suivant le recueil du sang. Les cellules ont ensuite été conservées dans de l'azote liquide pour la stimulation ultérieure.

1.2.1.1. Matériel, réactifs et consommable

▪ Matériels et consommable

- Tube hépariné de 10 ml
- Pipettes de 10 ml
- Tube Falcon de 50ml
- Tubes Eppendorf tube de 1.5ml
- Tubes Leucosep[®]
- Centrifugeuse
- Pipettes et embouts
- Pipettes pasteur 3ml
- Cryotubes de 1.8ml
- Mr Frosty[®]
- Congélateur -80°C
- Azote liquide

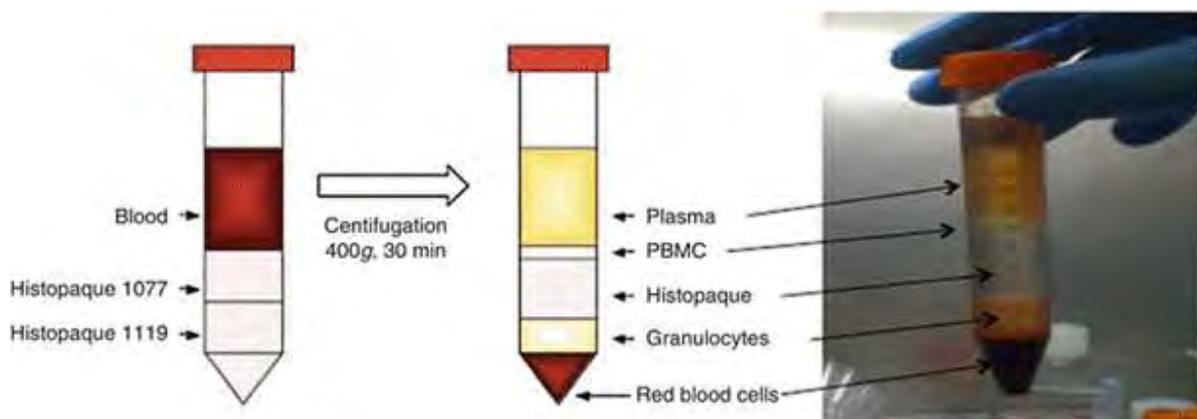
▪ Réactifs

- Ficoll ou Histopaque-1077[®]
- Pénicilline 100UI + streptomycine 100µg/ml
- L-glutamine 2mM
- RPMI 1640 contenant Pénicilline 100UI + streptomycine 100µg/ml + L-glutamine 2mM.
- FBS (foetal Bovis Sérum)
- AB Human serum
- DMSO (Diméthyle Sulfoxide)
- Solution de lavage (1%FBS/RPMI)
- Solution de congélation (FBS et FBS/20%DMSO)
- Bleu Turk
- Isopropanol

1.2.1.2. Principe de la séparation cellulaire

Les éléments figurés du sang périphérique, en milieu Ficoll-Triosil de haute densité, subissent durant la centrifugation une migration différentielle permettant leur séparation en deux fractions : d'une part, les érythrocytes et granulocytes qui sédimentent au fond du tube et d'autre part, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes qui restent à l'interface échantillon/milieu de séparation. Le mélange Ficoll-Triosil est une solution de densité égale à 1,077 renfermant :

- ✓ Du Ficoll de masse moléculaire élevée (400.000 Da), très soluble dans l'eau mais de faible viscosité intrinsèque, et possédant des propriétés agrégants vis-à-vis des hématies ;
- ✓ Du Triosil formant avec le Ficoll une solution de faible viscosité et de haute densité, et qui a pour rôle d'établir une osmolarité et une densité adaptée à la sédimentation des granulocytes (Figure 2).



. **FIGURE 2:** Séparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par gradient de Ficoll (241)

1.2.1.3. Mode opératoire

- ✓ Collecter 2x8 ml de sang dans un tube hépariné
- ✓ Mettre 15ml de Ficoll dans un tube Leucosep et centrifuger pendant 30s pour le faire descendre
- ✓ Ajouter le sang dans le tube contenant le Ficoll et centrifuger pendant 15 mn à 800 g sans freinage.
- ✓ Aliquoter 2 x 1ml de plasma dans du tube Eppendorf 1,5 et conserver à -20°C (pour la charge virale et autres tests)
- ✓ Transférer les PBMCs dans un nouveau tube Falcon de 50 ml et compléter le volume jusqu'à 50ml avec la solution de lavage (RPMI/PS) ; centrifuger à 1800 tpm pendant 10 minutes à 4° avec freinage.
- ✓ Pendre 2 x 300 µl de Buffy-Coat dans un tubes Eppendorf 1,5 (pour l'extraction de l'ADN) et congeler à -20° C.
- ✓ Verser le surnageant et suspendre doucement le culot dans 10ml de solution de lavage
- ✓ Procéder au comptage des cellules :
 - Suspendre les cellules dans 10 ml de 10%FCS/RPMI et transférer 50µl de la suspension cellulaire dans un puit d'une plaque de 96 puits
 - Centrifuger à 1800 tpm pendant 10 minutes à 4°C
 - Durant la centrifugation, ajouter 50 µl de bleu triptan (dilution au 1/2) dans le puit contenant les 50 µl de la suspension cellulaire et compter les cellules vivantes avec une cellule hématimétrique
 - Pour une cellule de comptage mesurant 0,1ul/16 carrés
 - Compter les cellules dans 2 quadrants de 16 carrés et diviser par 2 => n
 - Multiplier par 20.000 pour avoir la concentration cellulaire

1.2.2. Conservation des cellules mononucléées du sang périphérique

Les PBMC isolées ont été conservées à l'azote liquide avant leur stimulation. Cette démarche a permis la réalisation des tests immunologiques de façon simultanée pour tous les échantillons afin d'éviter toute variation technique.

- ✓ Après lavage les PBMCs sont récupérées dans un volume suffisant de 10%FCS/RPMI pour avoir une concentration de 20 millions de PBMC/ml.
- ✓ Mettre 200µl de la suspension de 20 millions de PBMC dans un cryotube soit 4 millions de PBMCs (répéter cette étape pour obtenir un second tube de 4 millions de PBMC).
- ✓ Ajouter dans le tube contenant les cellules le même volume de solution de conservation (10%FCS/20%DMSO/RPMI).
- ✓ Mettre les cryotubes à 4° C dans de l'isopropanol et conserver à -80°C pendant une nuit.
- ✓ Transférer les cellules à -150°C le lendemain

1.2.3. Décongélation des PBMC

A la fin du recrutement, les cellules préalablement conservées ont été décongelées pour procéder à leur stimulation avant le marquage.

1.2.3.1. Matériel et consommables

- ✓ Facs tube 5ml
- ✓ Tubes Falcon de 50ml
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Pipettes et embouts

1.2.3.2. Réactifs et adjuvants

- ✓ Pénicilline 100 UI + streptomycine 100 µg/ml
- ✓ RPMI 1640 contenant Pénicilline 100 UI + streptomycine 100 µg/ml + L-glutamine 2mM.
- ✓ FBS
- ✓ Bleu Trypan (0.4%)

1.2.3.3. Mode opératoire

- ✓ Préparer une solution de décongélation 10%FCS/RPMI.
- ✓ Mettre 2 ml de 10%FCS/RPMI dans des FACS tubes stériles de 5ml.
- ✓ Transférer les cellules dans les FACS tubes contenant les 2ml de 10%FCS/RPMI.
- ✓ Centrifuger pendant 5 mn à 1800tpm à 4° C.
- ✓ Décanter le surnageant et resuspendre les cellules dans 2 ml pour le comptage.
- ✓ Centrifuger 5 min à 1800tpm puis ajouter le volume pour obtenir $5 \cdot 10^6$ PBMC/ml.

1.2.4. Stimulation cellulaire

1.2.4.1. Adjuvants

- MPL, ligand du TLR4
- CPG OND, agoniste du TLR9
- R848, agoniste des TLR7 et TLR/8
- MF59, emulsion huile dans eau
- QilA, Saponin
- Phosphate d'aluminium, sel d'aluminium

1.2.4.2. Mode opératoire

Après décongélation, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été stimulées pendant 24 et 48h avec différentes concentrations d'adjuvants suivants (Life Invivogene): MPL, agoniste du TLR4, aux concentrations de 0,5, 2 and 10 μ g/ml ; CPG, agoniste du TLR9, à 1, 2,5 et 5 μ g/ml ; R848, agoniste du TLR7/8, à 0,5, 2 et 5 μ g/ml ; QilA, dérivé de la Saponine, à 1, 5 et 10 μ g/ml, et MF59, émulsion huile dans eau, aux dilutions de 1:1000, 1:300 et 1:100.

1.2.5. Analyse par la cytométrie en flux

Après stimulation, les réponses cytokiniques des cellules de l'immunité innée et des lymphocytes B ont ensuite été évaluées par cytométrie en flux utilisant le LSR Fortessa (Becton Dickinson) (Figure 3).

1.2.5.1. Principe

Le principe repose sur l'identification des antigènes cellulaires ou classe de différenciation (CD) ayant été préalablement mis en contact avec des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome et excités par un laser. L'identification est réalisée selon les caractéristiques d'émission des lumières par les cellules. Après introduction de l'échantillon, les cellules marquées sont entraînées dans un fin tube par le liquide de gainage ou FACS flow qui les contraint à défiler une à une à travers les trois faisceaux de laser d'excitation. Les informations issues de cette interaction sont recueillies par des filtres qui les transmettent à des PMT qui les transforment en signaux électriques.

Ces signaux électriques sont analysés par des intégrateurs couplés à un logiciel informatique. Ils apparaissent alors sous forme de spots définissant la taille (SSC = Side scatter) et la granularité (FSC = Forward scatter) des particules cellulaires. Les signaux de fluorescence apparaissent au niveau des PMT spécifiques de chaque fluorochrome. La combinaison de différents fluorochromes va permettre (SSC-fluorochrome ou FSC-fluorochrome ou entre

deux fluorochromes de spectres différents) de repérer les marqueurs de cellulaires et de les analyser.



FIGURE 3: Analyseur de cellules BD LSR Fortessa TM (242)

1.2.5.2. Mode opératoire

Les PBMC ont été lavées une fois avec du RPMI-1640 contenant 10% de FBS, une fois avec du PBS (Fresenius Kabi). Les cellules ont ensuite été perméabilisées par le eBioscience perméabilisation buffer (eBioscience) à la température ambiante et marquées avec des anticorps spécifiques pendant 30 minutes à 4°C dans une solution contenant un inhibiteur du récepteur du fragment du complément (anti-FcγR) (eBioscience) afin d'éviter les fixations non spécifiques. Pour la détermination des cytokines intracellulaires, 2.5×10^5 cellules ont été utilisées avec le panel d'anticorps monoclonaux suivants : FITC anti-CD19 (BD Biosciences), PerCP anti-CD4 (BD Biosciences), APC anti-CD14 (eBioscience), AF700 anti-HLA-DR (R and D systems), APC-Cy7 anti-CD3 (eBioscience), BV221 anti-TCRgd (BD Biosciences), BV605 anti-IL4 (BD Biosciences), BV650 anti-IFN-g (BD Biosciences), BV711 anti-IL-17 (BD Biosciences), BV786 anti-TNF α (BD Biosciences), PE anti-IFN- α (eBioscience), PE-CF594 anti-IL-10 (BD Biosciences), PE-Cy5 anti-CD40L (BD Biosciences), PE-Cy5.5 anti-CD56 (BD Biosciences) et PE-Cy7 anti-IFN- α (eBioscience). Après une incubation de 30 minutes, les cellules marquées ont été lavées et suspendues dans du PBS contenant 0.5% de BSA et 2mM EDTA et analysées au FACSCanto (BD Biosciences). Les résultats obtenus ont été analysés par le logiciel FlowJo.

1.2.6. Stratégie de gating

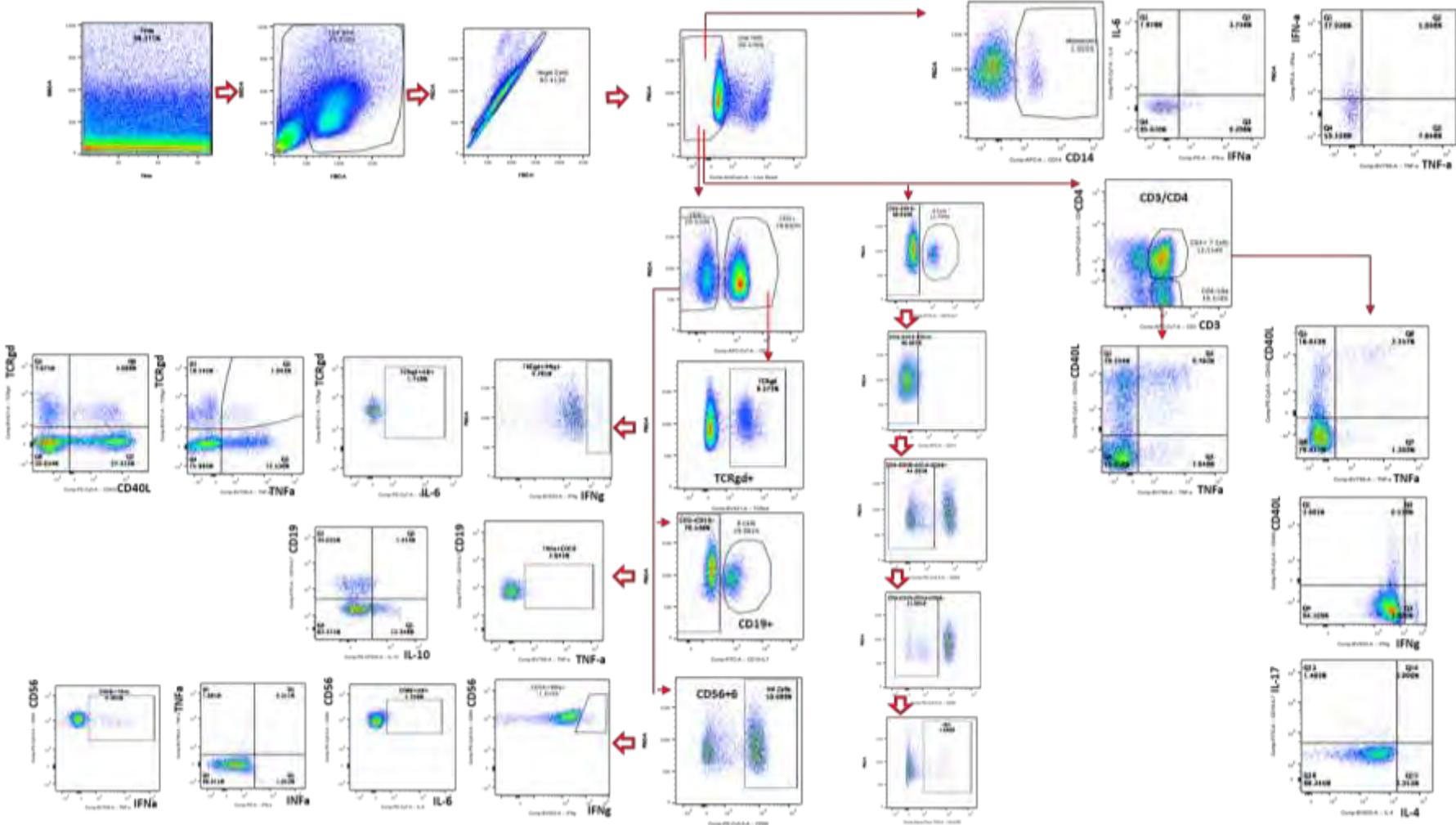


FIGURE 4: stratégie de gating

Chapitre 2 : Résultats

A partir des cellules totales obtenues sur le scatter plot FSC/SSC, les cellules doubles puis les cellules mortes ont été exclues. A partir des cellules viables, les différentes sous population cellulaires (monocytes, T CD4, T gd, B, NK) ont été étudiés afin de déterminer les marqueurs d'intérêt.

2.2. Réponses des monocytes au MPL

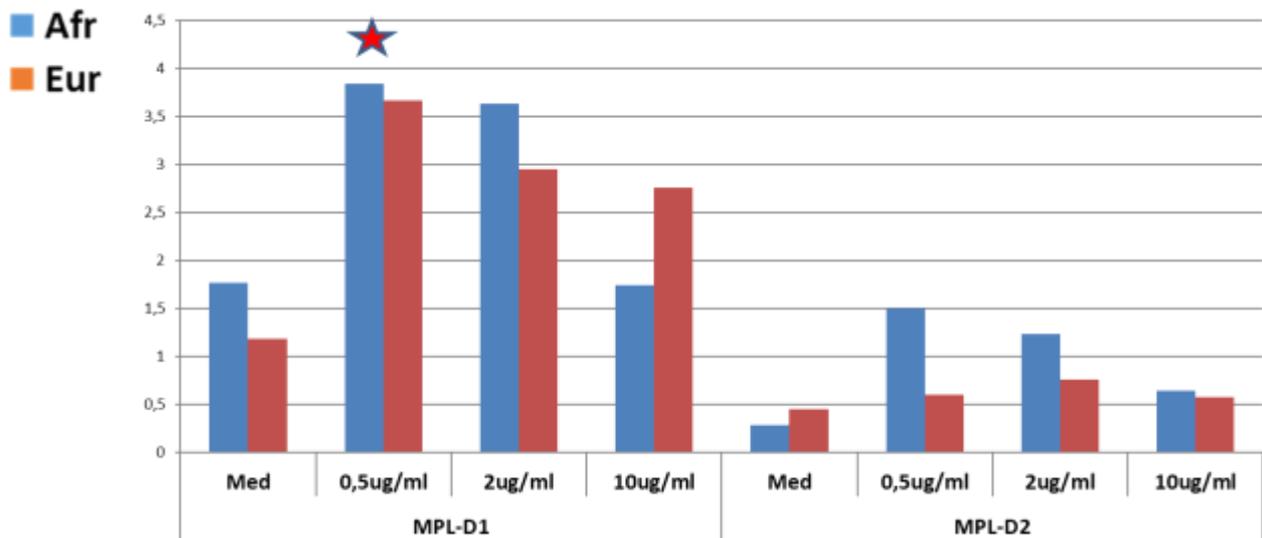


FIGURE 5: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au MPL

La stimulation pendant 24 à 48h par le **MPL** avec des concentrations de 0,5, 2 et 10 μ g/ml, à montrer qu'avec une concentration de 0,5 μ g/ml une réponse optimale TNF- α des monocytes était obtenue après une période de stimulation de 24 heures avec les échantillons des sujets Européens et Africains. La réponse obtenue après 24 heures de stimulation apparaissait meilleure que celle obtenue après 48 heures (Figures 5).

2.3. Réponses des monocytes au CPG

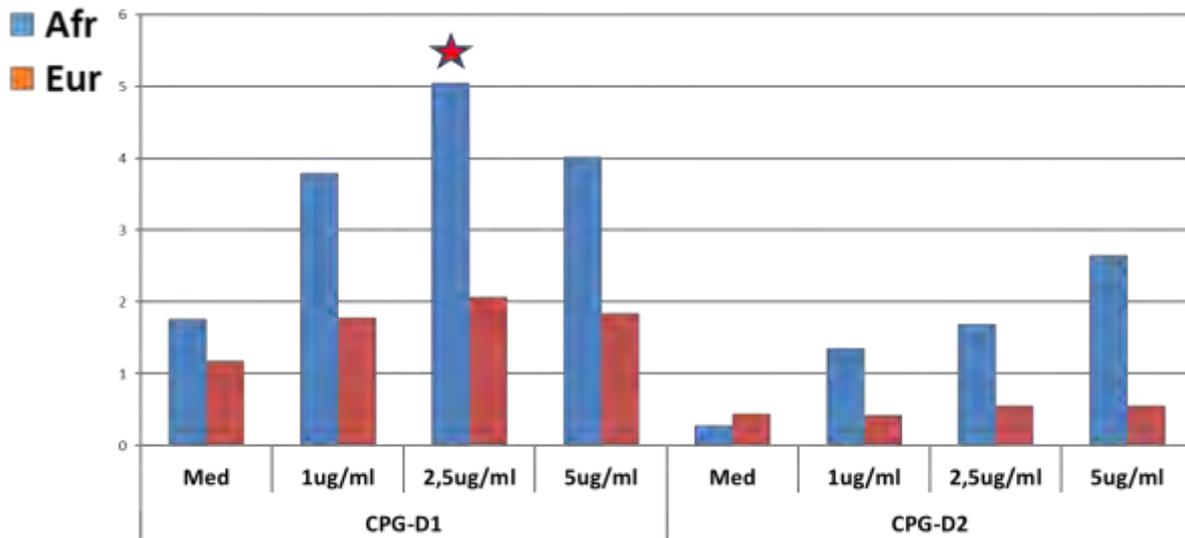


FIGURE 6: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au CPG

La stimulation pendant 24 et 48h par le **GPG** aux concentrations de 1, 2,5 et 5 μ g/ml a montré que la concentration de 2,5 μ g/ml donne la meilleure réponse TNF- α des monocytes après 24 heures de stimulation. Pour toutes les concentrations testées, la réponse obtenue après 24 heures de stimulation apparaissait plus importante aussi bien pour les échantillons des sujets Européens que pour ceux des Africains (Figures 6).

2.4. Réponses des monocytes au R848

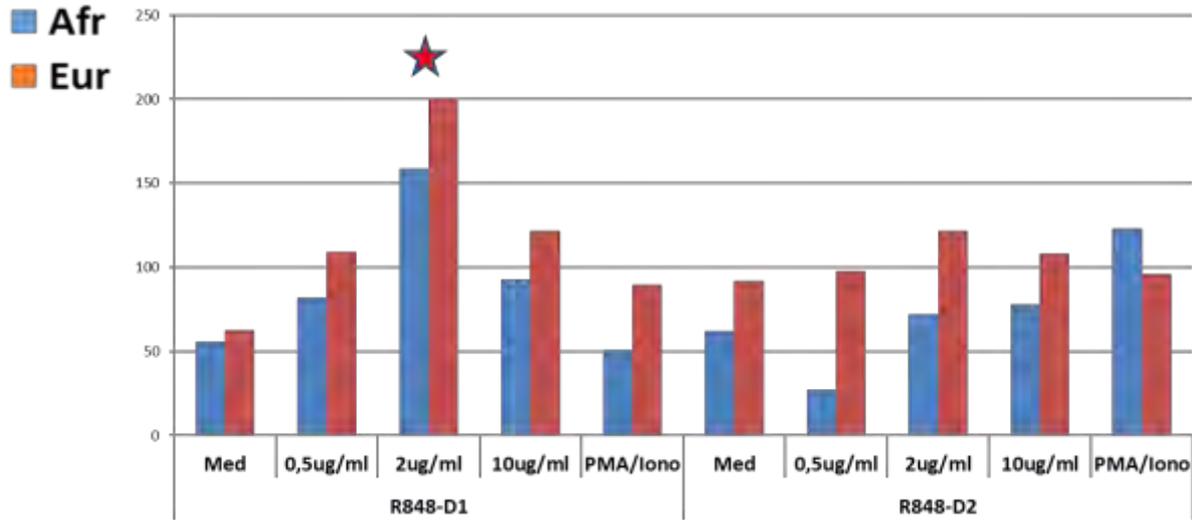


FIGURE 7: production de TNF- α - par les monocytes en réponse au R848

Après stimulation pendant 24 et 48h par le **R848** aux concentrations de 0,5, 2 et 10 μ g/ml, nos données ont montré une meilleure réponse TNF- α après 24 heures de stimulation. La concentration de 2 μ g/ml après stimulation sur 24 heures était ainsi plus optimale pour induire une réponse TNF- α des monocytes pour les échantillons des sujets Européens et Africains (Figure 7).

2.5. Réponses des monocytes au QilA

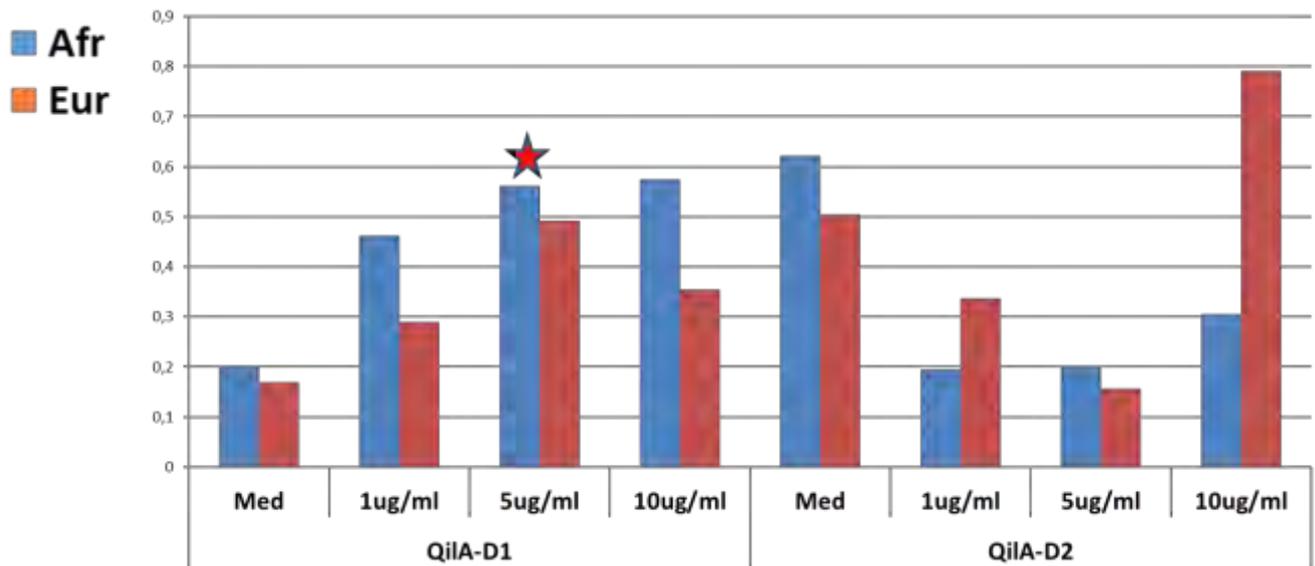


FIGURE 8: Production de TNF- α par les monocytes en réponse au QilA

A l'instar des autres adjuvant, le QilA a aussi été testé pendant 24 et 48h de stimulation. Bien que les concentrations de 1, 5 et 10 μ g/ml conféraient une bonne réponse à 24h de stimulation, celle de 5 μ g/ml pendant 24h de stimulation donnait la meilleure réponse pour les échantillons des sujets Européens et Africains (Figure 8)

Chapitre 3 : Discussion

Discussion

Les adjuvants jouent un rôle important dans les vaccins car et leurs actions sur le système immunitaire innée restent essentielles pour une réponse vaccinale optimale. Ainsi pour l'évaluation de la réponse vaccinale, l'effet de ces adjuvant doit être considéré du fait de leur effet souvent potentialisateur. Ainsi dans le but d'évaluer la différence géographique de la réponse immunitaire au vaccin, nous nous proposons d'abord évaluer la réponse cellulaire aux adjuvants les plus couramment utilisés chez des sujets vivants dans des zones géographiques différentes. A cet effet, la durée de stimulation ainsi que la concentration d'adjuvant pouvant induire une réponse cellulaire ex-vivo devrait d'abord être évalué.

Nos résultats ont ainsi montré que les monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes B ainsi que les cellules T $\gamma\delta$ a montré une meilleure réponse cellulaire aux différents adjuvants après 24h de stimulation. En termes de concentration optimale, nous avons trouvé que le MPL à 0,5 $\mu\text{g/ml}$, CPG à 2,5 $\mu\text{g/ml}$, R848 à 2 $\mu\text{g/ml}$, QilA à la concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ donnaient une réponse cellulaire optimale. Cependant, la stimulation par QilA ne produisait pas de réponse cellulaire conséquente.

Les adjuvants occupent un rôle de plus en plus important pour le développement des nouvelles générations de vaccin de par leur capacité améliorer l'immunogénicité des protéines sous-unitaires (243). L'un de ces adjuvants vaccinaux est le CpG, un oligodésoxynucléotide synthétique (ODN) reconnu par le récepteur endosomal Toll-like 9 (TLR9) (244) qui induit la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-18 et TNF- α) par les cellules d l'immunité innée (245;246). Nos données ont montré le CPG à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ est ainsi capable d'induire une réponse pro-inflammatoire des monocytes. De par cette propriété, le CPG induirait indirectement la maturation et la prolifération

des cellules NK, des cellules T et des monocytes/macrophages et d'induire par conséquent une immunité innée et spécifique (247).

Nous avons aussi montré le MPL était capable d'induire *in-vitro* l'activation des monocytes pour la production de TNF- α . Ce dérivé détoxifié du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif interagit en effet avec le TLR4 pour induire la production de différentes cytokines, telles que le TNF- α , l'IL-12 et l'IFN- γ , et favorise ainsi les réponses Th1 (248). C'est dans ce cadre qu'il a été approuvé pour une utilisation dans les vaccins contre l'allergie (249). Dans les essais cliniques sur le paludisme, des stratégies de combinaison de MPL avec d'autres adjuvants, comme l'alun (250) et la fraction 21 de *Quillaja saponaria* Molina (QilA), ont été explorées et ont abouti à la production de systèmes d'adjuvants (AS) (251). Dans notre étude, ces adjuvants ont aussi donné une réponse pro-inflammatoire des monocytes après 24 heures de stimulation. Le QilA est une fraction purifiée de la saponine de *Quillaja saponaria* avec une faible toxicité chez le modèle animal (252), avec la capacité de stimuler à la fois des réponses immunitaires humorales et également de promouvoir les réponses des cytokines Th1 (IL-2 et IFN- γ) aux antigènes sous-unitaires (253;254). Des essais cliniques pour l'évaluation de QS-21, en tant qu'adjuvant seul ou en combinaison avec d'autres immunostimulants (par exemple, AS01 et AS02) pour un vaccin contre le paludisme, sont en cours (255). Des essais cliniques impliquant des patientes atteintes d'un cancer du sein ou d'un cancer de la prostate ont montré que QilA est un adjuvant immunogène bien toléré capable d'induire des réponses d'anticorps spécifiques de l'antigène(256-258). Il existe aussi des tentatives de développement de combinaisons QilA avec le MPL et CpG ODN dans les vaccins contre le cancer (256).

CONCLUSION

Conclusion

La disparité de réponse immunitaire et de l'efficacité de certains vaccins est l'une des preuves les plus évidentes de l'impact géographique sur le système immunitaire. En effet, il existe une différence considérable l'exposition environnementale selon que l'on vit dans une zone rurale, urbaine ou semi-urbaine d'un pays en développement ou dans un pays développé. Il a été montré qu'au-delà de la génétique, le système immunitaire est fortement influencé par les expositions à l'environnement. Afin d'évaluer la différence géographique de la réponse immunitaire aux vaccins, nous devons d'abord évaluer la réponse cellulaire aux adjuvants utilisés et qui, au-delà du vaccin, pourraient avoir un rôle dans la réponse immunitaire. A cet effet, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été isolées par gradient de Ficoll, cryopréservées et plus tard stimulées pendant 24 et 48h avec différentes concentrations d'adjuvants. Les réponses cytokiniques des monocytes ont ensuite été évaluées par cytométrie en flux utilisant le LSR Fortessa (Becton Dickinson). L'analyse de la réponse pro-inflammatoire des monocytes a montré une meilleure réponse cellulaire aux différents adjuvants après 24h de stimulation. En termes de concentration optimale, nous avons trouvé que MPL à 0,5 µg/ml, CPG à 2,5µg/ml, R848 à 2µg/ml, QilA à 5µg/ml produisent une réponse cellulaire optimale. En définitive, MPL, CPG, R848 et QilA peuvent être utilisés *in-vitro* pour une stimulation de 24h.

REFERENCES

Références

Reference List

- (1) Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* 2015 Jan 15;160(1-2):37-47.
- (2) Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012 May 9;486(7402):222-7.
- (3) Liston A, Carr EJ, Linterman MA. Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol* 2016 Oct;37(10):637-46.
- (4) Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJ, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* 2015 Jan 15;160(1-2):37-47.
- (5) Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2014 Feb;58(4):470-80.
- (6) Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010 Aug 21;376(9741):606-14.
- (7) Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2005 Jan;18(1):21-5.
- (8) Pasteur L (1880) De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C.R. Acad. sci. Paris* 91:673-680.
- (9) Pasteur L (1885) Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C.R. Acad. sci. Paris* 101:765-772.
- (10) Germanier R, Furer E. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "S. typhi" Ty 21a. *Dev Biol Stand* 1983;53:3-7.
- (11) Theiler M, Smith HH. THE EFFECT OF PROLONGED CULTIVATION IN VITRO UPON THE PATHOGENICITY OF YELLOW FEVER VIRUS. *J Exp Med* 1937 May 31;65(6):767-86.
- (12) Theiler M, Smith HH. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med* 1937 May 31;65(6):787-800.
- (13) Belshe RB, Nichol KL, Black SB, Shinefield H, Cordova J, Walker R, et al. Safety, efficacy, and effectiveness of live, attenuated, cold-adapted influenza vaccine in an indicated population aged 5-49 years. *Clin Infect Dis* 2004 Oct 1;39(7):920-7.

- (14) Cheng X, Zengel JR, Suguitan AL, Jr., Xu Q, Wang W, Lin J, et al. Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets. *J Infect Dis* 2013 Aug 15;208(4):594-602.
- (15) He XS, Holmes TH, Zhang C, Mahmood K, Kemble GW, Lewis DB, et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J Virol* 2006 Dec;80(23):11756-66.
- (16) Salerno-Goncalves R, Pasetti MF, Szein MB. Characterization of CD8(+) effector T cell responses in volunteers immunized with Salmonella enterica serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *J Immunol* 2002 Aug 15;169(4):2196-203.
- (17) Wahid R, Fresnay S, Levine MM, Szein MB. Immunization with Ty21a live oral typhoid vaccine elicits crossreactive multifunctional CD8+ T-cell responses against Salmonella enterica serovar Typhi, S. Paratyphi A, and S. Paratyphi B in humans. *Mucosal Immunol* 2015 Nov;8(6):1349-59.
- (18) Agence de la santé publique du Canada (2013) Immunisation des sujets immunodéprimés.), <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/cig-gci/p03-07-fra.php>
- (19) GlaxoSmithKline (2015) PRODUCT MONOGRAPH: FLUVIRAL.), <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Fluviral.pdf>
- (20) sanofi pasteur (2006) PRODUCT MONOGRAPH : IMOVAX® Rabies.), https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=IMOVAX_E.pdf
- (21) sanofi pasteur (2012b)PRODUCT MONOGRAPH: ADACEL.), https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=ADACEL_E.pdf
- (22) sanofi pasteur (2012a)PRODUCT MONOGRAPH: Act-HIB.), https://www.vaccineshoppecanada.com/document.cfm?file=act_hib_e.pdf
- (23) Moorthy V, Hill AV. Malaria vaccines. *Br Med Bull* 2002;62:59-72.
- (24) Seder RA, Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):793-8.
- (25) Young DB, Stewart GR. Tuberculosis vaccines. *Br Med Bull* 2002;62:73-86.
- (26) Bershteyn A, Hanson MC, Crespo MP, Moon JJ, Li AV, Suh H, et al. Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *J Control Release* 2012 Feb 10;157(3):354-65.
- (27) Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, Drame M, Clement F, Hons E, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007 Aug 18;370(9587):580-9.
- (28) Bhagawati-Prasad VN, De LE, Keefe NP, Ryan LA, Carling J, Heath AW. CD40mAb adjuvant induces a rapid antibody response that may be beneficial in post-exposure prophylaxis. *J Immune Based Ther Vaccines* 2010 Feb 4;8:1.

- (29) Leroux-Roels I, Roman F, Forgue S, Maes C, De BF, Drame M, et al. Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study. *Vaccine* 2010 Jan 8;28(3):849-57.
- (30) Quattrocchi V, Pappalardo JS, Langellotti C, Smitsaart E, Fondevila N, Zamorano P. Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. *Vaccine* 2014 Apr 17;32(19):2167-72.
- (31) Xu W, Zheng M, Zhou F, Chen Z. Long-term immunogenicity of an inactivated split-virion 2009 pandemic influenza A H1N1 virus vaccine with or without aluminum adjuvant in mice. *Clin Vaccine Immunol* 2015 Mar;22(3):327-35.
- (32) Glenny A BG, Stevens M (1931) Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J pathol Bacteriol* 34:267-275.
- (33) Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines* 2007 Oct;6(5):685-98.
- (34) Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol* 1985 Jul;61(1):143-51.
- (35) Clausi A, Cumiskey J, Merkley S, Carpenter JF, Braun LJ, Randolph TW. Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. *J Pharm Sci* 2008 Dec;97(12):5252-62.
- (36) Hansen B, Belfast M, Soung G, Song L, Egan PM, Capen R, et al. Effect of the strength of adsorption of hepatitis B surface antigen to aluminum hydroxide adjuvant on the immune response. *Vaccine* 2009 Feb 5;27(6):888-92.
- (37) Hansen B, Sokolovska A, Hogenesch H, Hem SL. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine* 2007 Sep 4;25(36):6618-24.
- (38) Iyer S, Hogenesch H, Hem SL. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine* 2003 Mar 7;21(11-12):1219-23.
- (39) Levesque PM, Foster K, de AU. Association between immunogenicity and adsorption of a recombinant *Streptococcus pneumoniae* vaccine antigen by an aluminum adjuvant. *Hum Vaccin* 2006 Mar;2(2):74-7.
- (40) Romero Mendez IZ, Shi Y, Hogenesch H, Hem SL. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007 Jan 15;25(5):825-33.
- (41) Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, Hogenesch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005 Feb 18;23(13):1588-95.

- (42) Goto N, Akama K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol Immunol* 1982;26(12):1121-32.
- (43) Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* 1997 Aug;15(12-13):1364-71.
- (44) Kool M, Soullie T, van NM, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008 Apr 14;205(4):869-82.
- (45) Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Jul 29;105(30):10501-6.
- (46) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.
- (47) Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, et al. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 2011 Apr 22;34(4):514-26.
- (48) Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* 2007 Apr 15;178(8):5271-6.
- (49) Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008 Jul 1;181(1):17-21.
- (50) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008 Aug;9(8):847-56.
- (51) Rose WA, Okragly AJ, Patel CN, Benschop RJ. IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. *Sci Rep* 2015 Aug 14;5:13146.
- (52) Sun H, Pollock KG, Brewer JM. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro. *Vaccine* 2003 Feb 14;21(9-10):849-55.
- (53) Lindblad EB. Are mineral adjuvants triggering TLR2/TLR4 on dendritic cells by a secondary cascade reaction in vivo through the action of heat shock proteins and danger signals? *Vaccine* 2006 Feb 6;24(6):697-8.
- (54) Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 1999 Dec 15;163(12):6448-54.
- (55) Grun JL, Maurer PH. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol* 1989 Jun;121(1):134-45.

- (56) Serre K, Mohr E, Toellner KM, Cunningham AF, Granjeaud S, Bird R, et al. Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. *Mol Immunol* 2008 Aug;45(13):3558-66.
- (57) Grun JL, Maurer PH. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol* 1989 Jun;121(1):134-45.
- (58) Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, Appelberg R, Andersen P. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* 1997 Feb;65(2):623-9.
- (59) Della CG, Vesikari T, Sokal E, Lindert K, Nicolay U. Trivalent and quadrivalent MF59((R))-adjuvanted influenza vaccine in young children: a dose- and schedule-finding study. *Vaccine* 2011 Nov 3;29(47):8696-704.
- (60) Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della CG. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine* 2009 Nov 16;27(49):6959-65.
- (61) Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Hennig R. Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine* 2008 Jun 19;26(26):3209-22.
- (62) Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci Transl Med* 2010 Jan 20;2(15):15ra5.
- (63) Vesikari T, Forsten A, Borkowski A, Gaitatzis N, Banzhoff A, Clemens R. Homologous and heterologous antibody responses to a one-year booster dose of an MF59((R)) adjuvanted A/H5N1 pre-pandemic influenza vaccine in pediatric subjects. *Hum Vaccin Immunother* 2012 Jul;8(7):921-8.
- (64) Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van NG, Ott G, et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 1998 May 25;186(1):18-27.
- (65) Ott G, Barchfeld GL, Van NG. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine* 1995 Nov;13(16):1557-62.
- (66) Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van HP, Van NG. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm Biotechnol* 1995;6:277-96.
- (67) Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2008 Jan 24;26(4):552-61.
- (68) Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, DeBeauchamp J, Kanneganti TD, Webby RJ. Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Feb 15;108(7):2927-32.

- (69) Broderson JR. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* 1989 Sep;39(5):400-5.
- (70) Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Jul 6;32(3):173-86.
- (71) Dar P, Kalaivanan R, Sied N, Mamo B, Kishore S, Suryanarayana VV, et al. Montanide ISA 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. *Vaccine* 2013 Jul 18;31(33):3327-32.
- (72) Diefenbach CS, Gnjatic S, Sabbatini P, Aghajanian C, Hensley ML, Spriggs DR, et al. Safety and immunogenicity study of NY-ESO-1b peptide and montanide ISA-51 vaccination of patients with epithelial ovarian cancer in high-risk first remission. *Clin Cancer Res* 2008 May 1;14(9):2740-8.
- (73) Jang SI, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Lillehoj EP, Bertrand F, et al. Montanide ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Exp Parasitol* 2011 Jan;127(1):178-83.
- (74) van DE, Liu H, Huckriede A, Hak E. Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12(1):159-69.
- (75) Wassef NM, Alving CR. Complement-dependent phagocytosis of liposomes by macrophages. *Methods Enzymol* 1987;149:124-34.
- (76) Serre K, Giraud L, Siret C, Leserman L, Machy P. CD4 T cell help is required for primary CD8 T cell responses to vesicular antigen delivered to dendritic cells in vivo. *Eur J Immunol* 2006 Jun;36(6):1386-97.
- (77) Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, et al. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* 2006 Jun 15;176(12):7335-45.
- (78) Friede M, Muller S, Briand JP, Van Regenmortel MH, Schuber F. Induction of immune response against a short synthetic peptide antigen coupled to small neutral liposomes containing monophosphoryl lipid A. *Mol Immunol* 1993 Apr;30(6):539-47.
- (79) Kwong B, Liu H, Irvine DJ. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. *Biomaterials* 2011 Aug;32(22):5134-47.
- (80) Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta* 1997 Sep 4;1328(2):261-72.
- (81) Boks MA, Bruijns SCM, Ambrosini M, Kalay H, van BL, Storm G, et al. In situ Delivery of Tumor Antigen- and Adjuvant-Loaded Liposomes Boosts Antigen-Specific T-Cell Responses by Human Dermal Dendritic Cells. *J Invest Dermatol* 2015 Nov;135(11):2697-704.
- (82) Christensen D, Korsholm KS, Andersen P, Agger EM. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2011 Apr;10(4):513-21.

- (83) Hanson MC, Abraham W, Crespo MP, Chen SH, Liu H, Szeto GL, et al. Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intrastructural T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides. *Vaccine* 2015 Feb 11;33(7):861-8.
- (84) Meraz IM, Savage DJ, Segura-Ibarra V, Li J, Rhudy J, Gu J, et al. Adjuvant cationic liposomes presenting MPL and IL-12 induce cell death, suppress tumor growth, and alter the cellular phenotype of tumors in a murine model of breast cancer. *Mol Pharm* 2014 Oct 6;11(10):3484-91.
- (85) Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Rossi S, Panatto D. Effectiveness of adjuvanted seasonal influenza vaccines (Inflexal V (R) and Fluad (R)) in preventing hospitalization for influenza and pneumonia in the elderly: a matched case-control study. *Hum Vaccin Immunother* 2013 Jan;9(1):144-52.
- (86) Herzog C, Hartmann K, Kunzi V, Kursteiner O, Mischler R, Lazar H, et al. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine* 2009 Jul 16;27(33):4381-7.
- (87) Butts C, Maksymiuk A, Goss G, Soulieres D, Marshall E, Cormier Y, et al. Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011 Sep;137(9):1337-42.
- (88) Wu YL, Park K, Soo RA, Sun Y, Tyroller K, Wages D, et al. INSPIRE: A phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2011 Oct 7;11:430.
- (89) Lizotte PH, Wen AM, Sheen MR, Fields J, Rojasopondist P, Steinmetz NF, et al. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nat Nanotechnol* 2016 Mar;11(3):295-303.
- (90) Sainsbury F, Saxena P, Aljabali AA, Saunders K, Evans DJ, Lomonossoff GP. Genetic engineering and characterization of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles. *Methods Mol Biol* 2014;1108:139-53.
- (91) Ren Z, Ji X, Meng L, Wei Y, Wang T, Feng N, et al. H5N1 influenza virus-like particle vaccine protects mice from heterologous virus challenge better than whole inactivated virus. *Virus Res* 2015 Mar 16;200:9-18.
- (92) Tumban E, Peabody J, Peabody DS, Chackerian B. A universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. *Vaccine* 2013 Sep 23;31(41):4647-54.
- (93) Mathieu C, Rioux G, Dumas MC, Leclerc D. Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine* 2013 Oct;9(7):839-48.
- (94) Phelps JP, Dang N, Rasochova L. Inactivation and purification of cowpea mosaic virus-like particles displaying peptide antigens from *Bacillus anthracis*. *J Virol Methods* 2007 May;141(2):146-53.

- (95) Herrin DM, Coates EE, Costner PJ, Kemp TJ, Nason MC, Saharia KK, et al. Comparison of adaptive and innate immune responses induced by licensed vaccines for Human Papillomavirus. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10(12):3446-54.
- (96) Maugh TH. FDA approves hepatitis B vaccine. *Science* 1981 Dec 4;214(4525):1113.
- (97) Riedmann EM. Chinese biotech partnership brings first hepatitis E vaccine to the market. *Hum Vaccin Immunother* 2012 Dec 1;8(12):1743-4.
- (98) Matassov D, Cupo A, Galarza JM. A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1). *Viral Immunol* 2007 Sep;20(3):441-52.
- (99) Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G & Ross TM (2007) Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25(19):3871- 3878.
- (100) Prabakaran M, Kolpe AB, He F, Kwang J. Cross-protective efficacy of bivalent recombinant baculoviral vaccine against heterologous influenza H5N1 challenge. *Vaccine* 2013 Feb 27;31(10):1385-92.
- (101) Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol* 2007 Apr;81(7):3514-24.
- (102) D'Aoust MA, Couture MM, Charland N, Trepanier S, Landry N, Ors F, et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J* 2010 Jun;8(5):607-19.
- (103) Shoji Y, Prokhnevsky A, Leffet B, Vetter N, Tottey S, Satinover S, et al. Immunogenicity of H1N1 influenza virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(1):118-23.
- (104) Chen S, Zheng D, Li C, Zhang W, Xu W, Liu X, et al. Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *Biomed Res Int* 2015;2015:901817.
- (105) Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, Benvenuto E, et al. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. *Vaccine* 2009 Aug 13;27(37):5069-76.
- (106) Storni T, Lechner F, Erdmann I, Bachi T, Jegerlehner A, Dumrese T, et al. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 2002 Mar 15;168(6):2880-6.
- (107) Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, Hamelin ME, Koukavica I, Baz M, et al. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 2008 Jun 25;26(27-28):3395-403.
- (108) Kim MC, Song JM, O E, Kwon YM, Lee YJ, Compans RW, et al. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Mol Ther* 2013 Feb;21(2):485-92.

- (109) Petukhova NV, Gasanova TV, Ivanov PA, Atabekov JG. High-level systemic expression of conserved influenza epitope in plants on the surface of rod-shaped chimeric particles. *Viruses* 2014 Apr 21;6(4):1789-800.
- (110) Jones RM, Chichester JA, Mett V, Jaje J, Tottey S, Manceva S, et al. A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice. *PLoS One* 2013;8(11):e79538.
- (111) Kazaks A, Balmaks R, Voronkova T, Ose V, Pumpens P. Melanoma vaccine candidates from chimeric hepatitis B core virus-like particles carrying a tumor-associated MAGE-3 epitope. *Biotechnol J* 2008 Nov;3(11):1429-36.
- (112) Sominskaya I, Skrastina D, Dislers A, Vasiljev D, Mihailova M, Ose V, et al. Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes. *Clin Vaccine Immunol* 2010 Jun;17(6):1027-33.
- (113) Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, Deal EM, Mohamadzadeh M, Schmaljohn A, et al. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 23;100(26):15889-94.
- (114) Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 2004 Sep 1;173(5):3148-54.
- (115) Li X, Aldayel AM, Cui Z. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J Control Release* 2014 Jan 10;173:148-57.
- (116) Li X, Sloat BR, Yanasarn N, Cui Z. Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: data from a study with an improved experimental design. *Eur J Pharm Biopharm* 2011 May;78(1):107-16.
- (117) Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* 2008 May;38(5):1404-13.
- (118) Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *J Virol* 2008 Jan;82(2):785-94.
- (119) Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A, et al. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J Virol* 2007 Feb;81(3):1319-26.
- (120) Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bachi T, Bachmann MF. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 2002 Mar;32(3):818-25.
- (121) Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, Young SL, Baird MA. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunol Cell Biol* 2011 Aug;89(6):681-8.

- (122) Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van LE, Demaurex N, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002 Mar 1;168(5):2118-26.
- (123) Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van KY, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000 Mar 3;100(5):575-85.
- (124) Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM, Brown GD. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* 2008 Jun 13;283(24):16693-701.
- (125) Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* 2006 Jun;18(6):857-69.
- (126) Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke PJ, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 2008 Apr 15;111(8):4245-53.
- (127) Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, et al. Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* 2010 Sep 30;116(13):2277-85.
- (128) Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 2000 Oct 30;151(3):673-84.
- (129) Saluja SS, Hanlon DJ, Sharp FA, Hong E, Khalil D, Robinson E, et al. Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *Int J Nanomedicine* 2014;9:5231-46.
- (130) Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002 Dec 16;196(12):1627-38.
- (131) Cruz LJ, Rosalia RA, Kleinovink JW, Rueda F, Lowik CW, Ossendorp F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *J Control Release* 2014 Oct 28;192:209-18.
- (132) Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):599-606.
- (133) Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001 Sep 17;194(6):769-79.
- (134) Dhodapkar MV, Sznol M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* 2014 Apr 16;6(232):232ra51.

- (135) Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res* 2005 Aug 1;65(15):7007-12.
- (136) Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Amparan L, et al. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine* 2015 Aug 20;33(35):4228-37.
- (137) Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 2004 Mar 15;199(6):815-24.
- (138) D'Apice L, Costa V, Sartorius R, Trovato M, Aprile M, De BP. Stimulation of Innate and Adaptive Immunity by Using Filamentous Bacteriophage fd Targeted to DEC-205. *J Immunol Res* 2015;2015:585078.
- (139) Sartorius R, D'Apice L, Trovato M, Cuccaro F, Costa V, De Leo MG, et al. Antigen delivery by filamentous bacteriophage fd displaying an anti-DEC-205 single-chain variable fragment confers adjuvanticity by triggering a TLR9-mediated immune response. *EMBO Mol Med* 2015 Jul;7(7):973-88.
- (140) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van DT, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003 Nov 15;171(10):4984-9.
- (141) Kwissa M, Nakaya HI, Oluoch H, Pulendran B. Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood* 2012 Mar 1;119(9):2044-55.
- (142) Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 2011 Apr 12;29(17):3341-55.
- (143) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- (144) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 Mar 19;140(6):805-20.
- (145) Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines* 2007 Apr;6(2):133-40.
- (146) McKeage K, Romanowski B. AS04-adjuvanted human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 vaccine (Cervarix(R)): a review of its use in the prevention of premalignant cervical lesions and cervical cancer causally related to certain oncogenic HPV types. *Drugs* 2011 Mar 5;71(4):465-88.
- (147) Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* 2003 Apr;2(2):219-29.

- (148) Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2005 Dec;78(6):1273-80.
- (149) Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 2009 Nov 15;183(10):6186-97.
- (150) Vitoriano-Souza J, Moreira N, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, et al. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One* 2012;7(7):e40745.
- (151) Hu X, Liu R, Zhu N. Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice. *Immunobiology* 2013 Dec;218(12):1524-8.
- (152) Vernacchio L, Bernstein H, Pelton S, Allen C, MacDonald K, Dunn J, et al. Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) on T-helper cells when administered as an adjuvant with pneumococcal-CRM197 conjugate vaccine in healthy toddlers. *Vaccine* 2002 Nov 1;20(31-32):3658-67.
- (153) Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van MM, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006 Aug 14;24(33-34):5937-49.
- (154) Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines* 2007 Apr;6(2):133-40.
- (155) Nevens F, Zuckerman JN, Burroughs AK, Jung MC, Bayas JM, Kallinowski B, et al. Immunogenicity and safety of an experimental adjuvanted hepatitis B candidate vaccine in liver transplant patients. *Liver Transpl* 2006 Oct;12(10):1489-95.
- (156) Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 2001 Feb 15;166(4):2444-50.
- (157) Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, et al. The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol* 2002 Oct;32(10):2857-65.
- (158) BenMohamed L, Gras-Masse H, Tartar A, Daubersies P, Brahimi K, Bossus M, et al. Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *Eur J Immunol* 1997 May;27(5):1242-53.
- (159) Jackson DC, Lau YF, Le T, Suhrbier A, Deliyannis G, Cheers C, et al. A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Oct 26;101(43):15440-5.

- (160) Dillon S, Agrawal A, Van DT, Landreth G, McCauley L, Koh A, et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004 Apr 15;172(8):4733-43.
- (161) Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 2006 Feb;74(2):1113-20.
- (162) Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004 Mar 1;172(5):2739-43.
- (163) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001 Oct 18;413(6857):732-8.
- (164) Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 31;98(16):9237-42.
- (165) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004 Mar 5;303(5663):1529-31.
- (166) Durand V, Wong SY, Tough DF, Le BA. IFN-alpha/beta-dependent cross-priming induced by specific toll-like receptor agonists. *Vaccine* 2006 Apr 12;24 Suppl 2:S2-S3.
- (167) Le BA, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003 Oct;4(10):1009-15.
- (168) Kastenmuller K, Wille-Reece U, Lindsay RW, Trager LR, Darrah PA, Flynn BJ, et al. Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. *J Clin Invest* 2011 May;121(5):1782-96.
- (169) Ma F, Zhang J, Zhang J, Zhang C. The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice. *Cell Mol Immunol* 2010 Sep;7(5):381-8.
- (170) Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* 2014 Nov 12;32(48):6377-89.
- (171) Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine* 2010 Oct 21;28(45):7256-66.
- (172) Duraisingham SS, Roupheal N, Cavanagh MM, Nakaya HI, Goronzy JJ, Pulendran B. Systems biology of vaccination in the elderly. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;363:117-42.
- (173) Engel AL, Holt GE, Lu H. The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011 Mar;4(2):275-89.

- (174) Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Oct;287(4):R759-R766.
- (175) Nordlund JJ, Wolff SM, Levy HB. Inhibition of biologic activity of poly I: poly C by human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970 Feb;133(2):439-44.
- (176) Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboninosic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1976 Sep;57(3):599-602.
- (177) Lan T, Kandimalla ER, Yu D, Bhagat L, Li Y, Wang D, et al. Stabilized immune modulatory RNA compounds as agonists of Toll-like receptors 7 and 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Aug 21;104(34):13750-5.
- (178) Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 2000 Oct 15;165(8):4165-73.
- (179) de TA, Ballester M, Julier Z, Nembrini C, Jeanbart L, van der Vlies AJ, et al. Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Dec 3;110(49):19902-7.
- (180) Hafner AM, Corthesy B, Textor M, Merkle HP. Tuning the immune response of dendritic cells to surface-assembled poly(I:C) on microspheres through synergistic interactions between phagocytic and TLR3 signaling. *Biomaterials* 2011 Apr;32(10):2651-61.
- (181) Malyala P, Chesko J, Ugozzoli M, Goodsell A, Zhou F, Vajdy M, et al. The potency of the adjuvant, CpG oligos, is enhanced by encapsulation in PLG microparticles. *J Pharm Sci* 2008 Mar;97(3):1155-64.
- (182) Varypataki EM, van der Maaden K, Bouwstra J, Ossendorp F, Jiskoot W. Cationic liposomes loaded with a synthetic long peptide and poly(I:C): a defined adjuvanted vaccine for induction of antigen-specific T cell cytotoxicity. *AAPS J* 2015 Jan;17(1):216-26.
- (183) Wilson KD, Raney SG, Sekirov L, Chikh G, deJong SD, Cullis PR, et al. Effects of intravenous and subcutaneous administration on the pharmacokinetics, biodistribution, cellular uptake and immunostimulatory activity of CpG ODN encapsulated in liposomal nanoparticles. *Int Immunopharmacol* 2007 Aug;7(8):1064-75.
- (184) Beljanski V, Chiang C, Kirchenbaum GA, Olganier D, Bloom CE, Wong T, et al. Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant. *J Virol* 2015 Oct;89(20):10612-24.
- (185) Pavot V, Rochereau N, Resseguier J, Gutjahr A, Genin C, Tiraby G, et al. Cutting edge: New chimeric NOD2/TLR2 adjuvant drastically increases vaccine immunogenicity. *J Immunol* 2014 Dec 15;193(12):5781-5.
- (186) Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* 2002 Feb 1;293(1):151-63.

- (187) Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 1981;59(6):895-900.
- (188) Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 2006 Feb 20;203(2):413-24.
- (189) Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009 Jan;10(1):116-25.
- (190) Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI, et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011 Feb 24;470(7335):543-7.
- (191) Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Nov 13;364(9447):1757-65.
- (192) Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007 Jun 30;369(9580):2161-70.
- (193) Chen L, Xu M, Wang ZY, Chen BW, Du WX, Su C, et al. The development and preliminary evaluation of a new Mycobacterium tuberculosis vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP-10:ESAT-6 fusion protein with CpG DNA and aluminum hydroxide adjuvants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010 Jun 1;59(1):42-52.
- (194) Diwan M, Elamanchili P, Cao M, Samuel J. Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Curr Drug Deliv* 2004 Oct;1(4):405-12.
- (195) Mettens P, Dubois PM, Demoitie MA, Bayat B, Donner MN, Bourguignon P, et al. Improved T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in mice and monkeys induced by a novel formulation of RTS,S vaccine antigen. *Vaccine* 2008 Feb 20;26(8):1072-82.
- (196) Pichyangkul S, Gettayacamin M, Miller RS, Lyon JA, Angov E, Tongtawe P, et al. Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate P. falciparum MSP1(42) formulated with novel adjuvants or with alum. *Vaccine* 2004 Sep 28;22(29-30):3831-40.
- (197) Fox CB, Moutaftsi M, Vergara J, Desbien AL, Nana GI, Vedvick TS, et al. TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses. *Vaccine* 2013 Dec 2;31(49):5848-55.
- (198) Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002 Apr;2(4):251-62.
- (199) Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008 Nov;73(11):975-83.

- (200) Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 2002;20:551-79.
- (201) Zinkernagel RM, Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 2001 Jul 13;293(5528):251-3.
- (202) Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005 Jan 15;174(2):1037-45.
- (203) Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008 Apr;8(4):247-58.
- (204) Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006 May;6(5):417-23.
- (205) Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis* 2013 Jun;26(3):213-8.
- (206) Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J Immunol* 2009 Dec 1;183(11):7150-60.
- (207) Wynn JL, Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010 Jun;37(2):307-37.
- (208) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004 Jul;4(7):499-511.
- (209) Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 2005;23:387-414.
- (210) Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011 Apr;9(4):279-90.
- (211) Ifrim DC, Quintin J, Joosten LA, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, et al. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol* 2014 Apr;21(4):534-45.
- (212) van den Biggelaar AH, van RR, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000 Nov 18;356(9243):1723-7.
- (213) Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010 Jan;10(1):3-12.
- (214) Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 Jun;14(3-4):185-91.
- (215) Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, et al. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med* 2015 Apr 1;7(281):281ra43.

- (216) Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 2011 Jan;4(1):31-42.
- (217) Wagar LE, Bolen CR, Sigal N, Lopez Angel CJ, Guan L, Kirkpatrick BD, et al. Increased T Cell Differentiation and Cytolytic Function in Bangladeshi Compared to American Children. *Front Immunol* 2019;10:2239.
- (218) Wjst M. Is the increase in allergic asthma associated with an inborn Th1 maturation or with an environmental Th1 trigger defect? *Allergy* 2004 Feb;59(2):148-50.
- (219) Hori H, Watanabe M, Sakurai M. Infectious diseases in African children. *Acta Paediatr Jpn* 1993 Dec;35(6):553-8.
- (220) Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Jul;116(1):16-24.
- (221) Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002 Sep 19;347(12):911-20.
- (222) Eder W, Ege MJ, von ME. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006 Nov 23;355(21):2226-35.
- (223) Cooper PJ. Intestinal worms and human allergy. *Parasite Immunol* 2004 Nov;26(11-12):455-67.
- (224) Nicolaou N, Siddique N, Custovic A. Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy* 2005 Nov;60(11):1357-60.
- (225) Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005 Apr;5(2):141-5.
- (226) Bussmann C, Weidinger S, Novak N. Genetics of atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011 Sep;9(9):670-6.
- (227) Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006 Mar;7(2):95-100.
- (228) Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Hope for the hygiene hypothesis: when the dirt hits the fan. *J Asthma* 2005 May;42(4):225-47.
- (229) Renz H, Blumer N, Virna S, Sel S, Garn H. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy* 2006;91:30-48.
- (230) Kurata A. Hygiene hypothesis: why south/north geographical differences in prevalence of asthma and sarcoidosis? *Med Hypotheses* 2012 Sep;79(3):363-4.
- (231) Gan L, O'Hanlon TP, Gordon AS, Rider LG, Miller FW, Burbelo PD. Twins discordant for myositis and systemic lupus erythematosus show markedly enriched autoantibodies in the affected twin supporting environmental influences in pathogenesis. *BMC Musculoskeletal Disord* 2014 Mar 6;15:67.

- (232) Jacobson RM, Ovsyannikova IG, Targonski PV, Poland GA. Studies of twins in vaccinology. *Vaccine* 2007 Apr 20;25(16):3160-4.
- (233) Evans DM, Zhu G, Duffy DL, Frazer IH, Montgomery GW, Martin NG. A major quantitative trait locus for CD4-CD8 ratio is located on chromosome 11. *Genes Immun* 2004 Nov;5(7):548-52.
- (234) de Craen AJ, Posthuma D, Remarque EJ, van den Biggelaar AH, Westendorp RG, Boomsma DI. Heritability estimates of innate immunity: an extended twin study. *Genes Immun* 2005 Mar;6(2):167-70.
- (235) Giersing BK, Modjarrad K, Kaslow DC, Okwo-Bele JM, Moorthy VS. The 2016 Vaccine Development Pipeline: A special issue from the World Health Organization Product Development for Vaccine Advisory Committee (PDVAC). *Vaccine* 2016 Jun 3;34(26):2863-4.
- (236) Hunter PR, Harrison GA, Fraser CA. Cross-infection and diversity of *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff on an intensive care unit. *J Med Vet Mycol* 1990;28(4):317-25.
- (237) Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2014 Feb;58(4):470-80.
- (238) Kernodle DS. Problems with ascribing between-trial differences in BCG effectiveness to sensitization with environmental mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2014 Aug 15;59(4):605-7.
- (239) Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, Weir RE, Smith SG, et al. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *J Infect Dis* 2011 Oct 1;204(7):1075-85.
- (240) Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis* 2009 May 26;3(5):e442.
- (241) Jaatinen T, Laine J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2007 Jun;Chapter 2:Unit.
- (242) <https://www.bdbiosciences.com/en-in/instruments/research> instruments/research-cell-analyzers/lrsfortessa
- (243) Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013;4:114.
- (244) Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
- (245) Krieg AM. CpG DNA: trigger of sepsis, mediator of protection, or both? *Scand J Infect Dis* 2003;35(9):653-9.
- (246) Klinman DM. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004 Jun;4(6):937-46.

- (247) Harandi AM, Holmgren J. CpG DNA as a potent inducer of mucosal immunity: implications for immunoprophylaxis and immunotherapy of mucosal infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2004 Feb;5(2):141-5.
- (248) Pirahmadi S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND, Raz AA, Sani JJ. Combining Monophosphoryl Lipid A (MPL), CpG Oligodeoxynucleotide (ODN), and QS-21 Adjuvants Induces Strong and Persistent Functional Antibodies and T Cell Responses against Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) of *Plasmodium falciparum* in BALB/c Mice. *Infect Immun* 2019 Jun;87(6).
- (249) Hopkins M, Lees BG, Richardson DG, Woroniecki SR, Wheeler AW. Standardisation of glutaraldehyde-modified tyrosine-adsorbed tree pollen vaccines containing the Th1-inducing adjuvant, monophosphoryl lipid A (MPL). *Allergol Immunopathol (Madr)* 2001 Nov;29(6):245-54.
- (250) Abdulla S, Salim N, Machera F, Kamata R, Juma O, Shomari M, et al. Randomized, controlled trial of the long term safety, immunogenicity and efficacy of RTS,S/AS02(D) malaria vaccine in infants living in a malaria-endemic region. *Malar J* 2013 Jan 8;12:11.
- (251) Garcon N, Di PA. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum Vaccin Immunother* 2017 Jan 2;13(1):19-33.
- (252) Fleck JD, Kauffmann C, Spilki F, Lencina CL, Roehe PM, Gosmann G. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine* 2006 Nov 30;24(49-50):7129-34.
- (253) Kensil CR, Kammer R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opin Investig Drugs* 1998 Sep;7(9):1475-82.
- (254) Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijo AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007 Mar;8(3):153-61.
- (255) Zhu D, Tuo W. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res* 2016 Apr;3(4).
- (256) Gin DY, Slovin SF. Enhancing Immunogenicity of Cancer Vaccines: QS-21 as an Immune Adjuvant. *Curr Drug Ther* 2011 Aug;6(3):207-12.
- (257) Kim SK, Ragupathi G, Cappello S, Kagan E, Livingston PO. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine* 2000 Oct 15;19(4-5):530-7.
- (258) Slovin SF, Ragupathi G, Musselli C, Fernandez C, Diani M, Verbel D, et al. Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005 Jul;54(7):694-702.